

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

*OBOROVÁ*

*RADA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE*



**Disertační práce**

# VÝZKUM MECHANISMŮ ZÁVISLOSTI NA METAMFETAMINU

RESEARCH INTO THE MECHANISMS OF METHAMPHETAMINE  
DEPENDENCE

**PRAHA, 2020**

**MGR. TEREZA HAVLÍČKOVÁ**

Školitel: PharmDr. Magdalena Šustková, CSc.

Pracoviště: Ústav farmakologie, 3.LF UK

Studijní program: Farmakologie a toxikologie

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací. Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze práce a elektronická verze nahraná do Studijního informačního systému (SIS 3. LF UK) jsou totožné.

V Praze 30.9.2020

Tereza Havlíčková

**Identifikační záznam:**

HAVLÍČKOVÁ, Tereza. *Výzkum mechanismů závislosti na metamfetaminu /Research into the mechanisms of methamphetamine dependence/*. Praha, 2020, 90 stran, 2 přílohy. Disertační práce Ph.D. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav farmakologie. Vedoucí práce: PharmDr. Magdaléna Šustková, CSc.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce paní PharmDr. Magdaleně Šustkové, CSc., za její čas a trpělivost při vedení mé práce a za odbornou pomoc v průběhu celého mého studia. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům, kteří se se mnou podíleli na časově náročných experimentech. V neposlední řadě bych ráda poděkovala našim laboratorním asistentkám Evě, Blance, Markétě, Věře a Nadě za pomoc s experimenty a péči věnovanou laboratorním zvířatům.

Veliké díky patří také mému partnerovi Petrovi a našim dvěma dětem za trpělivost a podporu zvláště v posledních měsících mého studia.

## Souhrn

Předkládaná dizertační práce se věnuje problematice závislosti na metamfetaminu. V první části se zaměřuje na nový perspektivní výzkum možností využití ghrelinového antagonismu ke snížení posilovacích účinků metamfetaminu, se záměrem přispět k hledání nového efektivnějšího přístupu/léčiva v zatím neuspokojivé terapii závislosti na metamfetaminu. Práce shrnuje dosavadní poznatky zabývající se možnostmi ovlivnění mechanismů závislosti na návykových látkách pomocí ghrelinového antagonismu, a především se dále zaměřuje na naši vlastní experimentální práci. Testovali jsme efektivitu antagonisty receptorů GHS-R1A, látky JMV2959, v experimentálních modelech závislosti na metamfetaminu. Doposud existuje jen minimum prací věnujících se této problematice.

V experimentální části jsou shrnuty výsledky našich dvou studií sledujících vliv ghrelinového antagonisty na rozvoj závislostních posilovacích mechanismů, samotný příjem metamfetaminu a tendenci k relapsovému chování. S využitím metody drogou podmíněné preference místa (CPP) u potkanů jsme ve dvou experimentálních uspořádáních doložili významný vliv ghrelinového antagonismu na rozvoj utváření vazeb účinku metamfetaminu s prostředím i na již navozené vyhledávání prostředí spojeného s drogou. Prokázali jsme, že antagonist GHS-R1A má vliv na proces podmiňování prostředí spojeného s aplikací metamfetaminu, a také dokáže efektivně tlumit projevy již navozeného vyhledávání drogy (model „cravingu“). V modelu intravenózní autoaplikace/selfadministrace (IVSA) u potkanů jsme doložili významné snížení spontánního ustáleného příjmu metamfetaminu po premedikaci GHS-R1A antagonistou. Stejně tak výrazná tendence k relapsovému chování po nucené desetidenní abstinenci byla u potkanů premedikovaných ghrelinovým antagonistou významně snížena oproti kontrolní skupině. Naše výsledky tak podporují další výzkum možností využití ghrelinového antagonismu pro tlumení posilovacích účinků metamfetaminu, jež by mohl vést k potenciálně efektivnějšímu přístupu v terapii metamfetaminové závislosti.

Druhá část dizertační práce nahlíží na problematiku závislosti na metamfetaminu v souvislosti s depresivní poruchou, jednou z častých komorbidit závislostního chování. V experimentálním potkaním modelu deprese, po provedené bulbektomii čichových laloků, jsme pomocí in vivo mikrodialýzy sledovali hladiny vybraných neuromediátorů v nucleus accumbens, jež jsou zásadní pro rozvoj a udržení závislosti, a jejich změny po aplikaci dávky metamfetaminu. Poznání, že bazální hodnoty dopaminu a serotoninu, jejich metabolitů i glutamátu a gama-aminomáselné kyseliny (GABA) se významně liší u potkanů po

bulbektomii ve srovnání s kontrolní skupinou, potvrdilo, jak zásadní roli hrají zmíněné neuromediátory v mechanismech depresivní poruchy, a zároveň, že depresivní porucha významně ovlivňuje neuromediátorovou bilanci v mozkové struktuře důležité pro navození závislosti. Po aplikaci metamfetaminu jsme pozorovali výraznější efekt drogy právě u bulbektomovaných (OBX) zvířat. Zvířata reagovala na podaný metamfetamin významnými změnami v hladinách sledovaných neuromediátorů v nucleus accumbens, a také změnami v chování, které jsme během mikrodialýzy monitorovali. Zvýšená lokomoce a především typické metamfetaminem navozené stereotypní prvky v chování se u bulbektomovaných zvířat vyskytovaly ve významně větší intenzitě a s vyšší četností než u kontrolní skupiny. Naše studie tak poskytla komplexní neurobehaviorální popis akutního účinku metamfetaminu v potkaním modelu deprese, a je základem pro další budoucí výzkum, který by více osvětlil sdílené patofyziologické procesy, jež jsou podkladem depresivní poruchy a odměny/posilovacích účinků metamfetaminu.

#### Klíčová slova:

Metamfetaminová závislost, ghrelinový antagonismus, intravenózní selfadministrace, drogou podmíněná preference místa, bulbektomie, model deprese, in vivo mikrodialýza, změny chování

## Summary

The presented dissertation deals with the issue of methamphetamine dependence. The first part focuses on a research that seeks a new promising possibilities of using ghrelin antagonist to reduce the potentiating effects of methamphetamine, with the intent of a more effective approach/treatment in current unsatisfactory approach in methamphetamine dependence. Furthermore, it summarizes the already available knowledge that deals with the possibilities of influencing the mechanisms of substance abuse through ghrelin antagonism, and especially focuses on our own experimental work. We tested the efficacy of the GHS-R1A receptor antagonist, JMV2959, in experimental models of methamphetamine dependence. There is only a minimum of work dealing with this issue yet.

The experimental part summarizes the results of our two studies examining the effect of a ghrelin antagonist on the development of addictive reinforcing mechanisms, methamphetamine intake itself and the tendency to relapse behavior. Using the drug conditioned place preference (CPP) method in rats, we demonstrated in two experimental settings a significant effect of ghrelin antagonism on the development of methamphetamine binding to the environment and on the already induced search for a drug-related environment. We have shown that a GHS-R1A antagonist affects both the process of conditioning the environment associated with methamphetamine administration and can effectively suppress the manifestations of already induced drug search ("craving" model). In a rat model of intravenous self-administration (IVSA), we demonstrated a significant reduction in spontaneous steady-state methamphetamine intake after premedication with a GHS-R1A antagonist. Similarly, the marked tendency for relapsing behavior after forced 10 day abstinence was significantly reduced in rats premedicated with a ghrelin antagonist compared to controls. Our results thus support further research into the possibilities of using ghrelin antagonism to suppress the potentiating effects of methamphetamine, which could lead to a potentially more effective approach in the treatment of methamphetamine dependence.

The second part of the dissertation focuses on the issue of methamphetamine dependence in correlation with depressive disorder, one of the common comorbidities of addictive behavior. In an experimental rat model of depression, after olfactory bulbectomy, we monitored during *in vivo microdialysis*, the levels of selected neurotransmitters in the nucleus accumbens, which are essential for the development and maintenance of addiction, and their changes after methamphetamine application. The basal levels of dopamine,

serotonin, and their metabolites as well as glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) differ significantly in rats after bulbectomy compared to the control group confirmed the crucial role of these neurotransmitters in the mechanisms of depressive disorder, and that depressive disorder significantly affects non-mediator balance in the brain structure important for addiction. After methamphetamine administration, we observed a more predominant effect of the drug in bulbectomized (OBX) animals. The animals responded to methamphetamine by significant changes in the levels of neuromediators in the nucleus accumbens, as well as by behavioral changes that we monitored during microdialysis. Increased locomotion and especially typical methamphetamine-induced stereotyped activity occurred in bulbectomized animals at a significantly higher intensity and with a higher frequency than in the control group. To conclude, our study provided a comprehensive neurobehavioral description of the acute effect of methamphetamine in a rat model of depression, and is the basis for further future research to shed some light on the shared pathophysiological processes underlying on the depressive disorder and methamphetamine reward/reinforcing effects.

**Keywords:**

Methamphetamine addiction, ghrelin antagonism, intravenous self-administration, drug conditioned place preference, bulbectomy, depression model, in vivo microdialysis, behavioral changes



## Obsah

1.	Úvod do problematiky stimulačních drog a závislosti na návykových látkách .....	13
1.1.	Základní principy závislostních mechanismů .....	13
2.	Amfetaminy .....	16
2.1.	Současná situace zneužívání amfetaminů/metamfetaminu v Evropě a v ČR .....	16
2.2.	Historie a farmakologie amfetaminů/metamfetaminu.....	18
2.2.1.	Historie amfetaminů/metamfetaminu .....	18
2.2.2.	Struktura a chemické vlastnosti amfetaminů .....	20
2.2.3.	Farmakokinetika amfetaminů .....	20
2.2.4.	Farmakodynamika amfetaminů .....	21
2.3.	Zneužívání metamfetaminu a závislost .....	23
2.3.1.	Akutní projevy působení metamfetaminu .....	23
2.3.2.	Dlouhodobé projevy působení metamfetaminu .....	23
2.3.3.	Řešení intoxikací a terapie závislosti na amfetaminech/metamfetaminu .....	24
2.3.3.1.	Intoxikace a závažná předávkování .....	24
2.3.3.2.	Terapie závislosti na amfetaminech/metamfetaminu.....	25
2.3.3.2.1.	Agonisté monoaminů.....	25
2.3.3.2.2.	Antagonisté monoaminů .....	26
2.3.3.2.3.	Agonisté GABA receptorů .....	26
2.3.3.2.4.	Další potencionální terapeutické mechanismy .....	26
3.	Ghrelín a jeho úloha v mechanismech závislosti.....	27
3.1.	Komplexní účinky ghrelínu a možnosti využití ghrelinových mechanismů v terapii závislosti .....	27
3.2.	Shrnutí dalších výsledků získaných na našem pracovišti – v Ústavu farmakologie 3. LFUK .....	31
3.3.	Úloha ghrelínu v mechanismech závislosti na stimulantech amfetaminového typu.....	32
4.	Závislost a deprese.....	33

5.	Experimentální modely využívané k výzkumu závislosti na návykových látkách a deprese .....	34
5.1.	Experimentální modely využívané při výzkumu závislosti na návykových látkách .....	34
5.1.1.	Behaviorální metody .....	34
5.1.2.	Speciální modely používané v adiktologii .....	35
5.1.3.	Neurobiologické metody .....	36
5.2.	Experimentální modely deprese .....	36
6.	Cíle a hypotézy výzkumné práce .....	38
7.	Použité metodiky .....	39
7.1.	Zvířata použita v experimentech .....	39
7.2.	Použité chemikálie .....	40
7.3.	Drogou podmíněná preference místa (CPP).....	40
7.4.	Intravenózní autoaplikace (IVSA) .....	43
7.5.	Bulbektomie čichových laloků a následná mikrodialýza .....	46
7.5.1.	Procedura bulbektomie čichových laloků .....	46
7.5.2.	In vivo mikrodialýza .....	46
7.6.	Statistická analýza .....	48
8.	Výsledky .....	49
8.1.	Metamfetaminem podmíněná preference místa (CPP) .....	49
8.1.1.	Vliv ghrelinového antagonismu na projev metamfetaminem podmíněné preference místa .....	49
8.1.2.	Vliv ghrelinového antagonismu na průběh podmiňování metamfetaminem .....	51
8.2.	Intravenózní autoaplikace metamfetaminu (IVSA) .....	52
8.2.1.	Vliv ghrelinového antagonismu na spontánní příjem metamfetaminu .....	52
8.2.2.	Vliv ghrelinového antagonismu v testu tendence k relapsu.....	59
8.3.	In vivo mikrodialýza u potkanů v modelu deprese .....	60

8.3.1.	Rozdíly v bazálních hladinách neurotransmiterů a jejich metabolitů v NAc shell u potkanů v modelu deprese.....	61
8.3.2.	Změny hladin neurotransmiterů a jejich metabolitů v NAc shell navozené aplikací metamfetaminu.....	61
8.3.3.	Změny v chování zvířat v průběhu mikrodialýzy .....	65
9.	Diskuze .....	68
9.1.	Vliv premedikace JMV2959 na IVSA metamfetaminu u potkanů .....	68
9.2.	Vliv premedikace JMV2959 v testu tendence k relapsu po vynucené abstinenci (IVSA u potkanů) .....	68
9.3.	Vliv premedikace JMV2959 na metamfetaminem podmíněnou preferenci místa.....	69
9.4.	In vivo mikrodialýza nucleus accumbens u potkanů v modelu deprese, změny hladin neurotransmiterů navozené aplikací metamfetaminu .....	72
10.	Závěr.....	75
11.	Seznam použité literatury .....	76
12.	Přílohy .....	89
12.1.	Celkový seznam publikací autora .....	89
12.2.	Seznam přiložených publikací .....	90

## Seznam zkratk

2-AG	2-arachidonylglycerol
3-MT	3-metoxytyramin
5-HIAA	5-hydroxyindoloctová kyselina
5-HT	serotonin (5-hydroxytryptamin)
5-HT-1	serotoninový receptor 1
5-HT-2	serotoninový receptor 2
5-HT-3	serotoninový receptor 3
COMT	katechol-o-methyltransferaza
CPP	podmíněná preference místa
DA	dopamin
DAT	transportér pro dopamin
DOPAC	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina
GABA	gamaaminomáselná kyselina

GHS	growth hormone secretagogue
GHS-R1A	Growth Hormone Secretagogue Receptor 1A
H1	histaminový receptor 1
HVA	homovanilová kyselina
IVSA	intravenózní selfadministrace
MAO	monoaminoxidaza
MDMA	methylenedioxy-N-methylamfetamin (extáze)
mPFC	mediální prefrontální kůra
NA	noradrenalin
NAc	Nucleus accumbens
NAcSh	Nucleus accumbens shell
OBX	olfactory bulbectomy
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
VMAT	vezikulární transportér pro monoaminy
VTA	ventrální tegmentální oblast
$\alpha$ -2	adrenergní receptor alfa 2

# 1. Úvod do problematiky stimulačních drog a závislosti na návykových látkách

Stimulační drogy neboli psychostimulancia jsou látky, které způsobují celkové povzbuzení organismu a zvyšují duševní i tělesnou výkonnost. Mezi psychostimulancia patří již tradičně vedle kokainu a nikotinu látky ze skupiny budivých aminů, např. amfetamin, metamfetamin, MDMA atp. (Kalina et al., 2015).

Pro doplnění lze uvést, že v posledních dvou desetiletích se na drogové scéně objevují další nové syntetické látky s psychostimulačními případně i halucinogenními účinky. Nejčastěji se objevují mezi mladými lidmi např. na taneční scéně vedle již zmiňované tradiční “extáze“ (3,4-methylenedioxyamfetamin, MDMA). Jedním z důvodů rozšíření nových psychotropních substancí je snaha ilegálních výrobců obejít stávající legislativní normy a dostat na drogový trh látku, která zatím není na seznamech kontrolovaných látek, nebo jejíž prekurzory nepatří mezi monitorované substance. Dalším důvodem je touha mladých lidí vyhledávat nové stimulační a psychedelické zkušenosti a zážitky (Páleníček, 2005). V Evropě bylo od roku 2002 zachyceno zhruba 80 dalších derivátů fenylethylaminu/amfetaminu, asi 130 syntetických katinonů (základním zástupcem je mefedrin) a další stimulancia. V rámci svého postgraduálního studia jsem pomocí opakovaného dotazníkového šetření monitorovala rozšíření povědomí a zkušeností s katinony mezi českými vysokoškoláky. Výsledky tohoto výzkumu byly poskytnuty Národnímu středisku pro drogy a závislosti České republiky (NMS ČR) k přípravě výročních zpráv (Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v ČR v roce 2017 – vydáno 2018) a hlášení pro Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogové závislosti (EMCDDA). Tato epidemiologická problematika ale není zahrnuta v mé předkládané dizertační práci, jež se soustředí na náš experimentální výzkum.

Amfetaminy včetně metamfetaminu patří mezi návykové látky a mohou za určitých podmínek navodit závislostní chování. Závislost zvyšuje příjem návykové látky a prohlubuje její toxické působení na organismus. Výrazné změny v chování závislého mají závažné důsledky zdravotní, sociální i ekonomické s celospolečenskými dopady.

## 1.1. Základní principy závislostních mechanismů

Závislost na návykových látkách patří podle mezinárodní klasifikace nemocí (MKN – 10) dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) mezi **Poruchy**

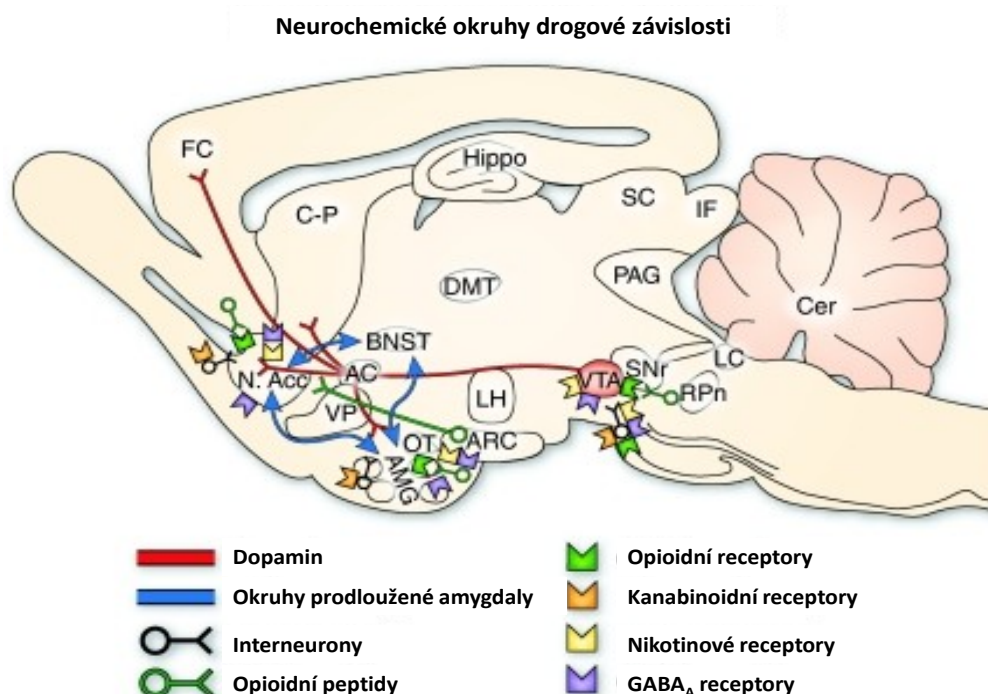
***duševní a poruchy chování způsobené užíváním psychoaktivních látek*** s označením F10-F19. Pro určení závislostního stavu se nejčastěji používá právě WHO klasifikace (v ČR aktualizovaná v roce 2013). Pokud jsou u jedince po dobu alespoň jednoho měsíce pozorovány společně tři nebo více z následujících projevů, případně pokud jsou alespoň tři z následujících projevů pozorovány opakovaně v průběhu jednoho roku, lze jeho stav označit za závislostní. Pro určení diagnózy se sledují nejčastěji tyto projevy:

- Silná touha nebo nutkavá potřeba vzít si návykovou látku
- Zhoršená schopnost kontrolovat chování spojené s užíváním návykových látek
- Somatický odvykací stav
- Prokazatelný rozvoj tolerance k účinkům návykové látky
- Postupné zanedbávání a vzdání se ostatních zájmů a potěšení ve prospěch užívání návykové látky
- Pokračování v užívání látky i přes prokazatelně škodlivé následky

Jedná se o chronická relabující onemocnění charakteristická nutkáním k vyhledání a aplikaci návykové látky, ztrátou kontroly nad omezením příjmu látky a následným rozvojem negativních emočních stavů, jako je například podrážděnost, úzkost, či psychická nepohoda (Koob a Volkow, 2010; Hyman et al, 2006). Znaky závislostního chování jsou pozorovány také např u poruch příjmu potravy (přejídání), „gamblingu“ (patologického hráčství), nutkavého nakupování, a tak podobně.

Aplikace všech dosud známých látek, které navozují závislost, vede při akutním podání ke zvýšení extracelulární koncentrace dopaminu v nucleus accumbens (NAc). Mezulimbické dopaminergní dráhy mezi ventrální tegmentální oblastí (VTA) a NAc a další propojení s mediální prefrontální kůrou (mPFC) a eventuálně s dalšími strukturami jsou součástí mozku systému odměny. Tyto struktury jsou zásadní pro pocity odměny a uspokojení a hrají roli při závislostech nejen na návykových látkách. Vyplavení dopaminu v NAc je hlavním indikátorem při určování důležitosti dané změny/odměny. Zároveň je iniciačním spouštěčem následných podmiňovacích, porovnávacích a kontrolních procesů (Volkow et.al., 2011). Mozkový systém odměny má velký význam v upevňování chování zásadního pro zachování druhu i rodu (konzumace energeticky bohaté potravy, sexuální chování apod.) Takové chování vede k vyplavení dopaminu v NAc a současně k navození libých pocitů u jedince. Jedinec pak má větší tendenci k opakování a vyhledávání právě tohoto chování a situací, protože jsou spojené s „odměnou“. Vedle dopaminu se mechanismů odměny a učení

účastní řada dalších mediátorových systémů (např. GABA, endokanabinoidy, glutamát, serotonin, acetylcholin, endogenní opioidy a další), viz Obr. 1. (Koob et Volkow, 2010; Koob et Volkow, 2016; Volkov et. al., 2011; Hyman et.al., 2006).



Obr. 1 Schématické znázornění neurochemických okruhů, podílejících se na vzniku závislosti na návykových látkách; schéma řezu potkaním mozkem. (Koob a Volkow, 2010).

Také amfetaminem/metamfetaminem navozené vylití dopaminu v NAc a následné podmiňovací a modulační procesy v řadě mozkových struktur, jsou řízeny a ovlivňovány dalšími mediátorovými systémy. Při opakovaných aplikacích návykových látek dochází v řadě mozkových struktur k významným epigenetickým změnám, jež se účastní projevů tolerance, senzitivace, abstinčních příznaků apod.

**Toleranci** je označováno vyhasínání účinku dané látky při jejím opakovaném užívání, což vede k postupnému navyšování dávek s cílem dosažení původního účinku. Schopností vyvolat **senzitivaci** se označuje stav navození zvýšené citlivosti organismu k účinku dané látky, na níž byla dříve vyvinuta závislost, v případě, že byla podána během abstinence, především dlouhodobé (Švihovec a kol, 2018). Senzitivaci pozorujeme i v mezolimbické oblasti, kdy po proběhlé alespoň několikadenní abstinenci navodí „provokační dávka“ návykové látky větší vylití dopaminu, než tomu bylo po dávce akutní. Při navození závislosti dokonce pouhá prezentace prvků (připomínek, “cues“) v okolí spojených s prožívanou

odměnou při užívání látky, vyvolává vylití dopaminu v NAc. Vytvořené podmíněné vazby „cues“ z okolí jako připomínek látkové odměny jsou tak významnými posilovači v rozvoji i udržení závislosti. (Koob a Volkow, 2010; Hyman et al, 2006). Abstinenční příznaky jsou projevem adaptačních změn spojených s opakovaným podáváním návykové látky a objevují se při jejím náhlém vysazení. U amfetaminových derivátů jde převážně o psychické příznaky opačné akutním efektům (viz dále).

Závislost na návykových látkách včetně amfetaminů/metamfetaminu představuje stále velmi závažný společenský problém, a přes veškeré úsilí terapie resp. prevence závislosti dosud není dostatečně efektivní. Je proto neustále vyvíjena snaha o výzkum mechanismů závislosti a hledání dalších nových možností v terapii závislostí.

Výzkum hledá zejména nové efektivnější mechanismy, které by zabránily častým relapsům závislosti, tedy návratům k závislostnímu chování. V posledních letech se objevují důkazy o působení některých periferních hormonů ovlivňujících příjem potravy na mezolimbický dopaminergní systém v mozku. Je prokázáno, že tyto hormony vedle známé homeostatické energetické kontroly příjmu potravy se sídlem v hypotalamu, mají svá vazebná místa i ve strukturách mozku systému odměny (Narayanan et al., 2010). Tyto hormony se tedy účastní nejen energeticko-homeostatického, ale i hédonického principu příjmu potravy a přejídání, a jsou tak v posledních několika letech zkoumány i v souvislostech s možnou účastí v závislostech na návykových látkách.

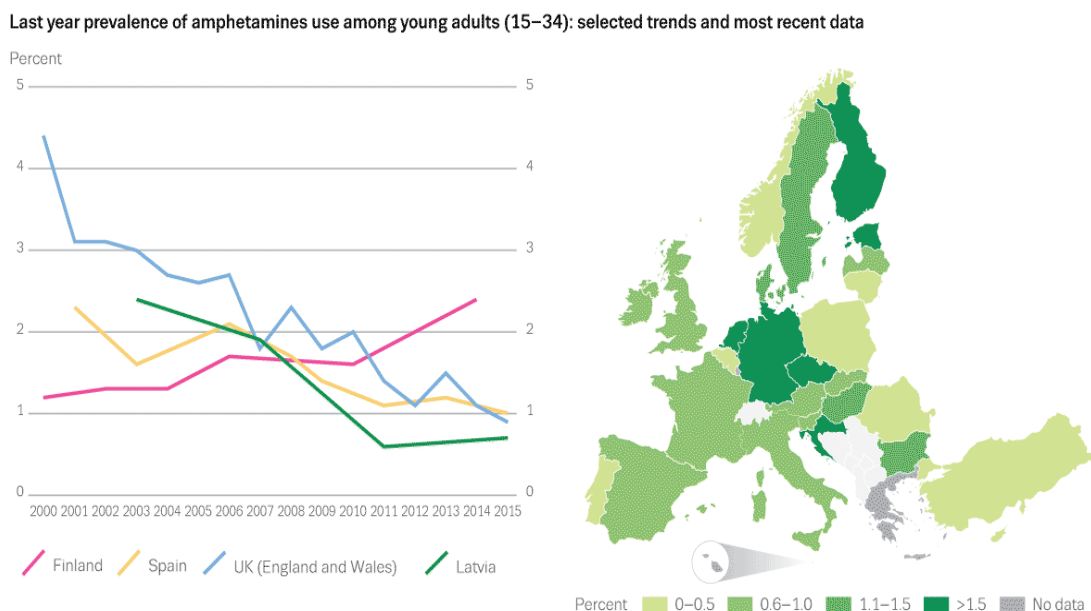
## **2. Amfetaminy**

### **2.1. Současná situace zneužívání amfetaminů/metamfetaminu v Evropě a v ČR**

V globálním měřítku je vedle nikotinu v Evropě velmi často zneužívanou stimulační látkou kokain a v některých regionech ho převyšují jiná stimulantia jako právě amfetamin a metamfetamin. Podle dat Evropského monitorovacího centra pro drogy a drogové závislosti (EMCDDA) je v zemích Evropské unie celoživotní prevalence mezi dospělými uživateli (15-64 let) 17,5 milionu uživatelů kokainu, 14 milionů uživatelů MDMA a 12,5 milionů uživatelů amfetaminů. V posledním roce užilo amfetaminy 1,8 milionu dospělých, z toho 1,3 milionu uživatelů tvořili mladí dospělí (15-34 let). Právě v zemích severní a střední Evropy hraje amfetamin a metamfetamin na drogovém trhu významnější roli než kokain (European drug report 2017: Trends and developments, 2017). Česká republika zaujímá v konzumaci i výrobě



metamfetaminu v Evropě prvenství již dlouhou řadu let. Dle grafického přehledu o drogové situaci z roku 2011 vydaném EMCDDA bylo zneužívání metamfetaminu detekováno převážně právě v České republice a na Slovensku viz. obr. 2 (The current drug situation in Europe, 2011).



Obr. 2 Užívání amfetaminů v posledním roce u mladých dospělých (15-34let) v celoevropském kontextu. (EMCDDA, The current drug situation in Europe, 2011)

Dle výroční zprávy o stavu ve věcech drog za rok 2017 bylo v České republice odhadem 47,8 tisíc problémových uživatelů pervitinu a opioidů. Jako problémové užívání drog je označováno pravidelné nebo dlouhodobé užívání metamfetaminu (pervitinu) nebo opioidů nebo jiných látek s vysoce závažnými následky, nebo injekční užívání jakékoliv návykové látky. Z těchto 47,8 tisíc problémových uživatelů drog tvoří více než dvě třetiny (34,7 tisíc) problémoví uživatelé pervitinu, tedy metamfetaminu. Z dostupných dat Národního monitorovacího střediska pro drogy vyplývá, že ačkoliv počet problémových uživatelů drog v roce 2016 mírně klesl oproti roku 2015 (47,7 tisíc) a zároveň klesl také odhadovaný počet problémových uživatelů pervitinu (35 tisíc v roce 2015), v roce 2017 došlo k opětovnému nárůstu jak problémových uživatelů drog, tak i uživatelů pervitinu (Obr. 3). Jde o závažný společenský problém, závažné zdravotní i socioekonomické dopady jsou devastující a léčba závislosti na amfetaminech je trvale nedostačující.

Rok	Problémoví uživatelé celkem		Uživatelé pervitinu		Injekční uživatelé drog	
	Počet	Na 1 000 os. 15–64 let	Počet	Na 1 000 os. 15–64 let	Počet	Na 1 000 os. 15–64 let
2003	29 000	4,02	18 800	2,61	27 800	3,86
2004	30 000	4,14	20 300	2,80	27 000	3,73
2005	31 800	4,37	20 500	2,82	29 800	4,10
2006	30 200	4,13	19 700	2,69	29 000	3,97
2007	30 900	4,20	20 900	2,84	29 500	4,01
2008	32 500	4,39	21 200	2,87	31 200	4,21
2009	37 400	5,04	25 300	3,40	35 300	4,75
2010	39 200	5,30	28 200	3,81	37 200	5,03
2011	40 200	5,51	30 900	4,24	38 600	5,29
2012	41 300	5,71	30 700	4,25	38 700	5,35
2013	45 200	6,32	34 500	4,82	44 400	6,22
2014	47 700	6,73	36 400	5,13	45 600	6,43
2015	47 700	6,78	35 000	4,98	43 400	6,18
2016	46 800	6,71	34 300	4,92	42 800	6,14
2017	47 800	6,91	34 700	5,02	43 700	6,32

Obr. 3. Střední hodnoty prevalenčních odhadů problémového užívání pervitinu a opioidů provedených multiplikační metodou za použití dat z nízkoprahových programů v l. 2003–2017 (Mravčík et al.; Národní monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti, 2018)

## 2.2. Historie a farmakologie amfetaminů/metamfetaminu

### 2.2.1. Historie amfetaminů/metamfetaminu

Amfetaminy jsou syntetické látky označované také jako „budivé aminy“. Jde o látky, které stimulují centrální nervový systém, takže po jejich aplikaci dochází k navození pocitů euforie, vzrušení a zvýšení bdělosti. Jako první z budivých aminů byl syntetizován

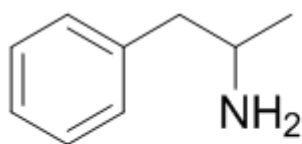
amfetamin. Přestože byl amfetamin syntetizován již v roce 1887 chemikem L. Edeleanu (Meyer et Quenzer, 2005), účinky amfetaminu byly podrobněji popsány až v roce 1910 britskými fyziology Bargerem a Dalem (Barger et Dale, 1910). Kromě terapeutického využití při léčbě encefalitis lethargica (Von Economova encefalitida) byly ve třicátých letech prováděny výzkumy zabývající se stimulačními účinky amfetaminu a navozením zlepšené výkonnosti. Docházelo i k prvním případům zneužití mezi studenty nebo sportovci. Za druhé světové války byl amfetamin podáván vojákům na obou stranách fronty (Kalina et al., 2003).

V České republice je mnohem rozšířenější metamfetamin, který byl poprvé syntetizován v Japonsku v roce 1919 chemikem Akirou Oगतou. Prekurzorem pro syntézu byl efedrin, látka z rostliny *Ephedra vulgaris*. Dnes se pro černý trh vyrábí z pseudoefedrinu, látky, kterou obsahují přípravky na léčbu chřipky, eventuálně z jiných prekurzorů. Ve dvacátých a třicátých letech minulého století byl amfetamin i metamfetamin hojně předepisován lékaři v různých indikacích. Uplatnění našly v terapii depresí, poruch nálad, poruch pozornosti, závislosti na alkoholu a kokainu, obezity i anorexie. V roce 1938 byl metamfetamin uveden v Německu na trh pod názvem „Pervitin“ a za druhé světové války byl hojně podáván německým vojákům, především pilotům pro zlepšení výkonu a koncentrace. Metamfetamin pro své vojáky využívaly i další armády, například japonská nebo americká. Naopak v jiných evropských zemích, především Velké Británii a Švédsku byl používán amfetamin. Armádní přebytky byly po skončení války prodávány civilnímu obyvatelstvu a od toho se odvíjí i současná preference jednoho nebo druhého aminu v různých zemích. V padesátých a šedesátých letech 20. století se lékařské používání obou látek začalo omezovat. S dlouhodobým užíváním těchto látek se začaly objevovat depresivní poruchy, poruchy nálad, hypertenze, závislost a další potíže. To vedlo ke změně situace a většímu převedení amfetaminu a metamfetaminu na ilegální trh. Časem byly amfetamin a metamfetamin z legálních terapeutických zdrojů na černém trhu nahrazeny ilegálně vyráběným sulfátem amfetaminu. Metamfetamin tak na začátku osmdesátých let 20. století vymizel z britského černého trhu a později tato situace nastala i ve většině evropských zemí. Naproti tomu v tehdejší Československu byl v sedmdesátých letech objeven jednoduchý návod na výrobu metamfetaminu a pod názvem původního německého léku „Pervitin“ se rozšířil na československé drogové scéně. Obvykle byl vyráběný v domácích laboratořích malými skupinkami uživatelů, kteří část své produkce měli pro vlastní spotřebu a část prodali, aby nakoupili prekurzory pro další výrobu. Jako prekurzor k výrobě metamfetaminu sloužil efedrin (lék Solutan) a později hlavně pseudoefedrin volně dostupný v lécích určených k podpůrné terapii chřipkových stavů (Modafen, Paralen Plus,

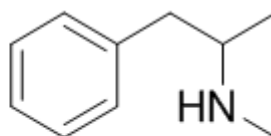
Nurofen Stopgrip). Ani po zpřísnění podmínek výdeje těchto léčivých přípravků se nelegální výroba metamfetaminu nijak výrazně nesnížila, organizované skupiny dovážely přípravky s pseudoefedrinem z okolních zemí (zejména z Polska), kde legislativa pro výdej těchto přípravků nebyla tak přísná. I v současné době je Česká republika předním evropským výrobcem a zároveň i konzumentem metamfetaminu. (Kalina, et al., 2015; EMCDDA & Europol, 2010; Mravčík et al., 2018, European monitoring centre for drugs and drug addiction, 2017).

### 2.2.2. Struktura a chemické vlastnosti amfetaminů

Z chemického hlediska jsou amfetaminy deriváty fenylisopropylaminu. Struktura se podobá struktuře adrenalinu, noradrenalinu či například dopaminu (viz. obr. 4. a 5.), z čehož také plynou centrálně stimulační a sympatomimetické účinky amfetaminů. Velmi dobře byla popsána stereoselektivita optických antipodů, kdy S-enantiomery vykazují pětikrát vyšší psychostimulační aktivitu než R-enantiomery (Lamb et al., 2009).

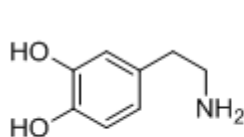


amfetamin

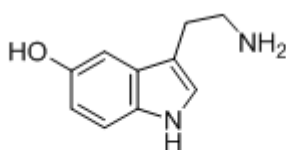


metamfetamin

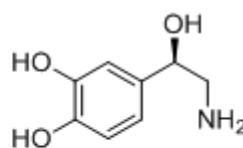
Obr. 4 Struktury amfetaminu a metamfetaminu (dle Lamb et al., 2009)



dopamin



serotonin



noradrenalin

Obr. 5 Struktury přirozených neuromediátorů dopaminu, noradrenalinu a serotoninu (dle Meyer et Quenzer, 2005)

### 2.2.3. Farmakokinetika amfetaminů

Síla, délka a rychlost nástupu účinku amfetaminů závisí na způsobu podání. Metamfetamin může být užíván perorálně i intravenózně, řada uživatelů dává přednost šňupání či kouření (Elkashef et al., 2008, Karila et al., 2010). Amfetamin je nejčastěji užíván perorálně a intravenózně (Meyer et Quenzer, 2005). Biologická dostupnost metamfetaminu po

perorálním podání a kouření je přibližně 67%.  $T_{MAX}$ , kdy je dosaženo maximální plazmatické koncentrace je přibližně 6 minut po intravenózním podání, 150 minut po vdechování kouře a 216 minut po perorální aplikaci. Maximální centrální účinek nastupuje přibližně do 15 minut po intravenózní aplikaci, 18 minut po aplikaci kouřením a 180 minut po perorálním podání. Maximální plazmatická koncentrace metamfetaminu po intravenózním podání (dávky 30mg/70kg) byla 108  $\mu\text{g/l}$ , po perorálním podání stejné dávky 94  $\mu\text{g/l}$  (Cruickshank et Dyer, 2009). Eliminační poločas metamfetaminu se liší v závislosti na použitém stereoizomeru, kdy pro L-metamfetamin představuje 13,3-15 hod, pro D-metamfetamin pouze 10,2-10,7 hodiny (Mendelson et al., 2006). Rose a Grant uvádí, že eliminační poločas je po intravenózním podání prakticky srovnatelný s perorálním (12 resp. 10 hodin)(Rose et Grant, 2008). Metamfetamin je v játrech metabolizován na aktivní metabolit amfetamin. Průměrně 70% dávky metamfetaminu je vylučováno močí do 24 hodin po aplikaci jednak jako nezměněný metamfetamin (30-50%), dále 4-hydroxymetamfetamin (do 15%) a v neposlední řadě jako amfetamin (10%). Exkreci metamfetaminu lze podpořit okyselením moči (Cruickshank et Dyer, 2009).

#### 2.2.4. Farmakodynamika amfetaminů

Účinek amfetaminu a metamfetaminu je velmi podobný. Sami uživatelé někdy účinky těchto dvou látek jen obtížně rozeznávají od sebe. Zda jde o amfetamin či metamfetaminu lze s určitostí odlišit pouze laboratorní analýzou (Lincová et al., 2002). V animálních modelech u potkanů (Yokel et Pickens, 1973) a u makaků (Balster et Schuster, 1973) vyvolal amfetamin i metamfetamin stejný efekt na chování i příjem drogy. Řada prací ale popisuje silnější efekt metamfetaminu v neurochemických a behaviorálních modelech (Goodwin et al., 2009; Hall et al., 2007). Obě látky působí jako nepřímá sympatomimetika s účinkem jak periferním, tak i centrálně stimulačním (Lincová et al., 2002; Lüllmann et al., 2004, Feldman et al., 1997). Sympatomimetický účinek amfetaminů je dán jejich chemickou strukturou, která je velmi blízká katecholaminovým neurotransmiterům noradrenalinu a dopaminu (viz. obr. 4 a 5). Jak v periférii, tak v centrálním nervovém systému zvyšují amfetaminy hladiny tělu vlastních neurotransmiterů - monoaminů. Využívají k tomu tři možné mechanismy. Jedním z nich je **inverzní účinek na synaptické transportéry zpětného vychytávání neurotransmiterů**. Nejvyšší afinitu mají amfetaminy k přenašečům pro dopamin (DAT) a noradrenalin, zatímco pro serotoninové přenašeče je jejich afinita na rozdíl od kokainu nižší (Howell et Kimmel, 2008). Vzhledem k podobné struktuře s monoaminy se amfetaminy snadno dostávají pomocí

těchto přenašečů i přímo do synapsí, tam **zvyšují uvolňování monoaminů z vezikul do synaptické štěrby**, ovlivněním vezikulárních přenašečů pro monoaminy (VMAT). Oba mechanismy vedou k masivnímu vylití monoaminů do synapsí. Třetím mechanismem působení amfetaminů je inhibice **odbourávání katecholaminů pomocí inaktivace katechol-O-methyltransferázy (COMT) a monoaminoxidázy (MAO)**(Lüllmann et al., 2004, Lincová et al., 2002; Rose et Grant, 2008; Cruickshank et Dyer, 2009). Prudký masivní účinek metamfetaminu je dán jeho velmi rychlým prostupem přes hematoencefalickou bariéru a jeho působením přímo v CNS (Rose et Grant, 2008). Vzhledem k tomu, že metamfetamin vede ke značnému vyplavení noradrenalinu (dle in vitro studií má dvojnásobný vliv na vyplavení noradrenalinu oproti dopaminu a až 60 krát vyšší schopnost vyplavit noradrenalin než serotonin), dochází po jeho užití k výrazným somatickým projevům (Cruickshank et Dyer, 2009). Uvolněný noradrenalin přispívá převážně k projevům, jako je vazokonstrikce, stimulace srdeční činnosti, zvýšený krevní tlak, mydriáza, pocení, vzestup tělesné teploty, snížení chuti k jídlu, snížení pocitů únavy, euforie, vzrušení a krátkodobé zlepšení koncentrace a kognitivních funkcí (Lüllmann et al., 2004; Cruickshank et Dyer, 2009). Zvýšené hladiny dopaminu naopak výrazněji ovlivňují chování závislého (Howell et Kimmel, 2008).

Jak již bylo uvedeno, jednou ze zásadních struktur v mozku pro závislostní chování a účinek nejen stimulačních návykových látek, je nucleus accumbens. Všechny látky, které vyvolávají závislost, významně zvyšují v akutní dávce hladiny dopaminu v NAc (Volkow et al., 2011). Kromě dopaminu hrají významnou roli v závislostních mechanismech další neurotransmitery, například endogenní opioidy (endorfiny, enkefaliny), endokanabinoidy, (anandamid, 2-AG atp), 5-HT, kyselina  $\gamma$  – aminomáselná (GABA), glutamát a další. Vybrané mozkové struktury a neurochemické dráhy důležité v mechanismech odměny nejen u drogových závislostí znázorňuje *obrázek 1*. Podobně jako kokain, i amfetaminy aktivují vlastní uvolňování dopaminu v NAc a amygdale pomocí přímého působení na dopaminergní neurony (Koob a Volkow, 2010). Vyplavení serotoninu vede k ovlivnění serotoninergních neuronů v mozku, které ovlivňují termoregulační funkce (navozují hypertermii), dýchání, bolestivé projevy, sexuální chování, úzkost a kognitivní funkce (Cruickshank et Dyer, 2009).

## **2.3. Zneužívání metamfetaminu a závislost**

### *2.3.1. Akutní projevy působení metamfetaminu*

Nižší a střední dávky metamfetaminu (zhruba 15-80 mg) obvykle zlepšují náladu, bdělost, empatii, působí euforicky, anorekticky a stimulačně (Cruickshank et Dyer, 2009). Vyšší dávky (nad 100 – 300 mg) bývají vedle euforie a excitace často spojeny s úzkostí, výraznými stereotypními pohyby, agresivitou, halucinacemi až psychózou (výroční zprávy NMS a EMCDDA za rok 2017; Feldman 1997).

Vzhledem k centrálně stimulačnímu charakteru metamfetaminu patří k jeho účinkům odstranění únavy, urychlení myšlení, usnadnění asociací a zvýšená hovornost. Díky aktivaci sympatiku pak pocity zvýšené síly a energie. Mezi další účinky se řadí nechutenství a snížení příjmu potravy (anorektický účinek), pro které byly dříve amfetaminy a jim příbuzné látky široce používány v terapii obezity (Kalina a kol., 2015). Jako negativní účinky se mohou objevit úzkost, neklid a nespavost, paranoia a zejména ve vyšších dávkách psychotické příznaky, psychózy a halucinace. Dále lze pozorovat zvýšenou tepovou i dechovou frekvenci, zvýšenou tělesnou teplotu až horečku, zvýšení krevního tlaku, nadměrné pocení, třes a neurologické symptomy jako jsou bolesti hlavy a poruchy vidění (Rose et Grant, 2008). Vyšší dávky a vyšší plazmatické hladiny metamfetaminu byly také spojeny s vyšším výskytem násilného chování (Cruickshank et Dyer, 2009). Při předávkování dochází k výraznému zvýšení krevního tlaku a srdeční frekvence vedoucímu až k projevům tachykardie a zrychlenému dýchání. Dalšími znaky předávkování jsou znatelně rozšířené zornice, vzrušení až agresivita a třes. Ve vážných případech může dojít až k přehřátí organismu, srdečnímu, renálnímu nebo jaternímu selhání až komatu. Objevují se změny chování a vnímání, kdy dochází k projevům rozrušení, akutní psychózy a k sebevražedným sklonům (Cruickshank et Dyer, 2009).

### *2.3.2. Dlouhodobé projevy působení metamfetaminu*

Po několikadenním užívání metamfetaminu dochází k vyčerpání katecholaminů (zejména dopaminu a noradrenalinu) v nervových zakončeních a synapsích a z toho plynoucím následkům. U uživatelů se objevuje vyčerpání organismu, deprese a letargie. Z psychických symptomů se může objevit přetrvávající úzkost, paranoia, nespavost, sluchové halucinace, psychotické a násilné chování až sebevražedné sklony. Neurotoxické působení zejména na úrovni dopaminergních synapsí, pokles dopaminergních transportérů, vyčerpání zásob dopaminu atp., mohou vést k parkinsonským příznakům. Somatické následky

dlouhodobějšího užívání metamfetaminu zahrnují zvýšený krevní tlak, přetrvávající únavu, podvýživu, ztrátu vlasů, sexuální dysfunkce, dentální problémy (abraze zubů způsobené stereotypním chováním – přežvykováním, zvýšená kazivost zubů a záněty dásní často ze zanedbané dentální hygieny) a úbytek na váze (Rose et Grant, 2008). Při dlouhodobém užívání může dojít k rozvoji toxické psychózy, halucinací (zejména sluchových), bludů a vzniku závislosti (Kalina a kol., 2015). Toxická psychóza má většinou projevy takřka neodlišitelné od paranoidní schizofrenie (Cruickshank et Dyer, 2009). Devastující dopady dlouhodobého užívání metamfetaminu jsou způsobené jak vlastním déletrvajícím působením látky na organismus, tak projevy abstinenčního syndromu při vysazení drogy.

Odvykací stav je provázen spíše psychickými projevy než fyzickými symptomy. Nejčastěji se vyskytují projevy podrážděnosti, úzkosti, neklidu a tenzí, poruchy nálad a spánku (Rose et Grant, 2008). Po vysazení metamfetaminu se obvykle nejprve dostaví únava, několikadenní spánek a epizody příjmu velkého množství potravy („vlčí hlad“). Dále se objevují projevy deprese, úzkostné stavy a u některých jedinců i sebevražedné myšlenky. Dostavuje se silná touha po droze („craving“), podrážděnost a další poruchy spánku. Tyto projevy mohou přetrvávat v různé intenzitě týdny až měsíce (Kalina a kol., 2015), u některých závislých až 12 měsíců (Rose et Grant, 2008), kdy sice touha po droze postupně slábne, ale může se náhle opět objevit v silné intenzitě (Kalina a kol., 2015).

Opakované užívání metamfetaminu vede k významným epigenetickým neuroadaptačním a dalším změnám provázejícím neurotoxicitu. Vedle již zmíněných abstinenčních příznaků, rozvoje toxické psychózy a dalších poruch, může dlouhodobá stimulace metamfetaminem vést k destrukci dopaminergních neuronů v nigrostriálních drahách, k výskytu třesu a dalších poruch hybnosti a ke zvýšenému riziku rozvoje Parkinsonovy choroby v pozdějším věku (Cruickshank et Dyer, 2009; Trash et al, 2009). Další rizika plynoucí z dlouhodobého užívání jsou společná s jinými návykovými látkami. U injekčních uživatelů metamfetaminu se objevují i rizika spojená s přenosem infekčních onemocnění, jako jsou především hepatitidy a přenos viru HIV (Elkashef et al., 2008), dále poškození tkání v místech vpichů, záněty, abscesy atp.

### *2.3.3. Řešení intoxikací a terapie závislosti na amfetaminech/metamfetaminu*

#### *2.3.3.1. Intoxikace a závažná předávkování*



Akutní obtíže a případy předávkování jsou léčeny symptomaticky. Nejzávažnějšími a život ohrožujícími projevy intoxikace amfetaminy bývá hypertermie, dehydratace, hypertenze, srdeční arytmie, akutní infarkt myokardu, centrální mozková příhoda, křeče, delirium, psychóza až smrt uživatele. Mezi nefarmakologická opatření při intoxikacích patří například ochlazování pacientů s hypertermií a postupná rehydratace. K terapii záchvatů úzkosti a paniky a křečových stavů jsou obvykle využívány *benzodiazepiny* (midazolam, diazepam, klonazepam atp.), zklidnění při tachykardii navodí *betablokátory* (atenolol atp.) případně *antiarytmika* (amiodaron, lidokain atp.) a toxickou psychózu lze zmírnit *antipsychotiky* (haloperidol, risperidon atp.).

#### 2.3.3.2. Terapie závislosti na amfetaminech/metamfetaminu

Samotná léčba (met)amfetaminové závislosti spočívá zatím podle potřeby v symptomatické farmakoterapii a především v psychoterapii, která kromě intenzivní počáteční léčby závislosti zahrnuje i dlouhodobou podporu abstinence (Kalina a kol., 2015). Dosud u nás ani ve světě není oficiálně schválena adiktologická farmakoterapie s využitím specifických anti-cravingových nebo substitučních látek určených pro léčbu (met)amfetaminových závislostí. Některé látky jsou testovány v rámci studií nebo sporadicky užívány „off label“. Za víceméně cílený symptomatický přístup lze v současné době považovat užití látek, které přímo ovlivňují jednotlivé mediátory účastníci se účinku metamfetaminu. Současně jde o látky, které jsou používány často k terapii depresivních poruch a jiných onemocnění.

##### 2.3.3.2.1. Agonisté monoaminů

Z látek, které zasahují do aktivity serotoninu lze jmenovat především látky ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), které jsou primárně využívány jako antidepresiva. Jde například o *sertralin*, *paroxetin*, *fluoxetin* (Rose et Grant, 2008). Další významnou skupinou jsou látky, které působí jako dopaminergní agonisté, *modafinil* je stimulační látka neamfetaminového charakteru, která je využívána zejména v terapii narkolepsie, spánkové apnoe či hypersomie. Klinické studie prokázaly účinnost modafinilu v terapii závislosti na kokainu, z čehož se usuzuje, že by mohl být účinným i v terapii metamfetaminové závislosti (Karila et al., 2010). *Bupropion* je antidepresivum působící mechanismem inhibice zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu. Používá se především při odvykání kouření (Rose et Grant, 2008; Karila et al, 2010). Výrazný potenciál

v terapii závislosti na metamfetaminu má *methylyfenidát*. Jde o stimulant, který je využíván v terapii ADHD u dětí i dospělých ke zlepšení koncentrace a soustředění. V terapii závislosti na metamfetaminu by methylyfenidát mohl plnit především funkci substituce, podobně jako metadon v terapii opioidní závislosti (Rose et Grant, 2008). Zvláště u injekčních uživatelů metamfetaminu, kteří měli v minulosti potíže se soustředěním, se jeví substituce methylyfenidátem jako poměrně účinná (Hampl, 2004). Mechanismus účinku spočívá v afinitě k dopaminovým a noradrenalinovým synaptickým transportérům, je to inhibitor zpětného vychytávání monoaminů jako kokain, ale jeho efekt je mírnější a mnohem delší. Methylyfenidát tak zvyšuje podobně jako amfetamin i metamfetamin koncentrace monoaminů v synapsích, má však mnohem menší tendence způsobovat neuroadaptaci a vést k závislosti (Karila et al., 2010). Proběhlo také několik studií s dextroamfetaminem (d-amfetamin), který stejně jako metamfetamin způsobuje vyplavení dopaminu, noradrenalinu a serotoninu. Vzhledem k obdobnému mechanismu účinku i závislostnímu potenciálu jde tedy o formu substituce. Uživatelé pod kontrolou užívali d-amfetamin jinou než intravenózní cestou. Došlo ke snížení rizikového chování a celkového příjmu amfetaminu, metamfetaminu či dokonce kokainu. V australské dvojité zaslepené placebem kontrolované studii byla úspěšně použita forma d-amfetaminu s řízeným uvolňováním (Karila et al., 2010).

#### 2.3.3.2.2. Antagonisté monoaminů

*Mirtazapin* se řadí mezi agonisty a antagonisty. Jde o serotoninového (5-HT-2 a 5-HT-3), histaminového (H1) a adrenergního ( $\alpha$ -2) antagonistu a serotoninového 5-HT-1 agonistu (Rose et Grant, 2008). Jako antidepresivum s částečným anxiolytickým a sedativním účinkem je využíván u závislých na metamfetaminu v ambulantní léčbě (Karila et al., 2010). Dalšími v terapii užívanými vhodnými antagonisty dopaminových receptorů jsou *haloperidol* a *risperidon*, které jsou užívány k celkovému zklidnění, k tlumení agitovanosti, agresivity a psychotických projevů (Rose et Grant, 2008).

#### 2.3.3.2.3. Agonisté GABA receptorů

Z agonistů GABA receptorů byl testován vliv na projevy závislosti na metamfetaminu u *baclofenu*, *gabapentinu* a *vigabatrinu*. Na rozdíl od baclofenu a gabapentinu prokázal pouze vigabatrin pokles příjmu metamfetaminu ve studiích prováděných na 30 (resp. 28) pacientech závislých na metamfetaminu (a/nebo kokainu) (Karila et al., 2010).

#### 2.3.3.2.4. Další potenciální terapeutické mechanismy

I když výše zmíněné látky je možné v terapii závislosti použít „off label“, dosud neexistuje oficiální specifická a dostatečně efektivní léčba závislosti na metamfetaminu a proto výzkum stále hledá nové efektivnější přístupy v terapii. Jedním z nadějných směrů by mohly být hormony ovlivňující příjem potravy (amylin, leptin, orexin), zejména pak na ghrelinové mechanismy. Ghrelin je ligandem sekretagogového receptoru pro růstový hormon (GHS-R1A). Jedná se o endogenní peptid, který se účastní mimo jiné také řízení příjmu potravy. Již bylo v některých studiích prokázáno, že genová ablace či farmakologický antagonismus GHS-R1A vedle ke snížení navozeného pocitu odměny a k redukci posilovacích účinků u alkoholu, nikotinu, kokainu, amfetaminu a opioidů v jednoduchých animálních neurobehaviorálních modelech (myši, potkani)(viz. přehledné souhrny Engel et al., 2014; Panagopoulos et Ralevski, 2014; Koopmann et al., 2018, Zallar et.al., 2017). Vztah ghreluinu a metamfetaminu byl dosud studován minimálně, proto jsme se zaměřili na experimentální výzkum možné účasti ghrelinové centrální signalizace v mechanismech v závislosti na metamfetaminu (viz níže).

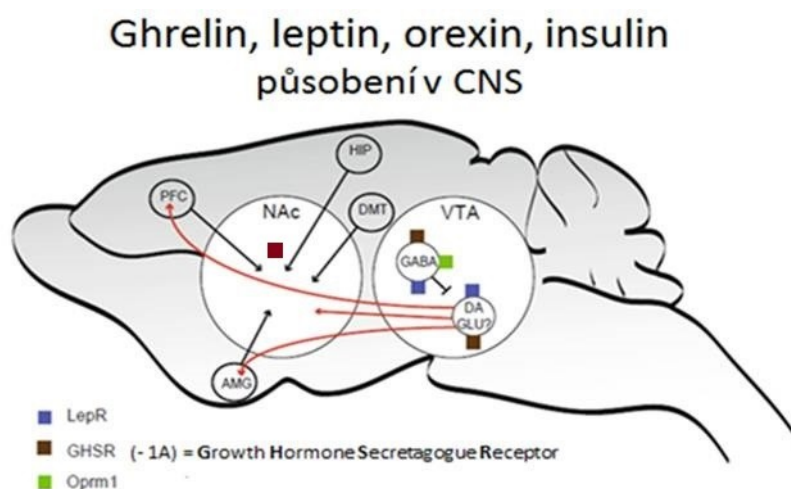
Závislostní chování bývá provázáno řadou komorbidit, velmi časté jsou duševní poruchy a onemocnění typu depresí, úzkostí, anxiety, poruch spánku atp. V některých případech vyplyne závislostní chování ze samoléčby těchto komorbidit, jindy jsou duševní poruchy následkem závislosti, často jde o kombinaci obojího. Přestože jsou vztahy mezi duševními poruchami a závislostmi intenzivně zkoumány, neurobiologické mechanismy vzájemných vztahů mezi závislostí a depresí nejsou dosud plně objasněny (Šustková ve Švihovec et al, 2019, Testa et al, 2013). Proto jsem v druhé části své dizertační práce hledala v experimentálním potkaním modelu neuromediátorové změny, k nimž dochází během depresivního stavu v nucleus accumbens, které by se mohly podílet na rozvoji závislosti. Dále jsem testovala, zda a jak se budou lišit neuromediátorové změny v nucleus accumbens vyvolané metamfetaminem u zvířat bez deprese a v modelu deprese (viz dále).

### **3. Ghrelin a jeho úloha v mechanismech závislosti**

#### **3.1. Komplexní účinky ghreluinu a možnosti využití ghrelinových mechanismů v terapii závislosti**

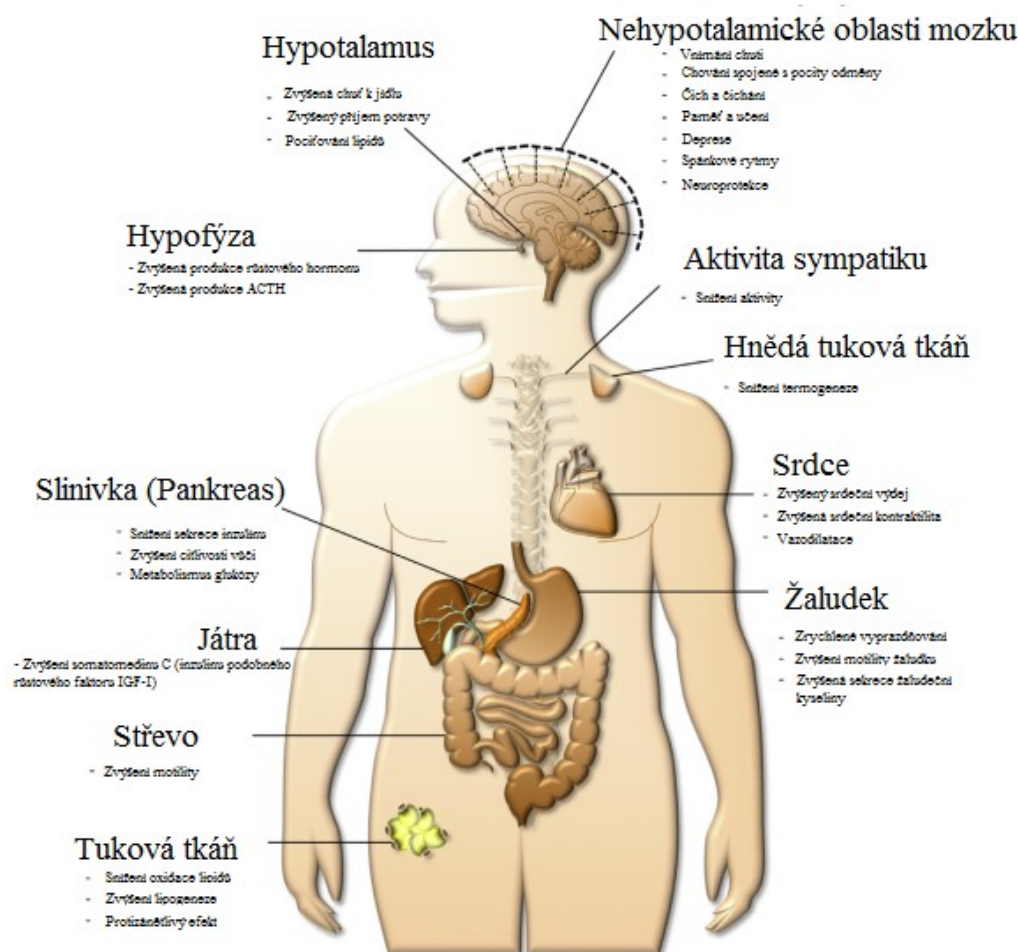
Ghrelin je endogenní peptid, který byl objeven v roce 1999 Kojimou (Kojima et al., 1999). Jeho objevu předcházela výzkum syntetických látek ovlivňujících vylučování růstového hormonu (growth hormone secretagogues, GHS). Tímto výzkumem se zabýval již

v sedmdesátých letech Bowers (Bowers et al. 1977). Receptor se specifickým vztahem ke GHS, tedy GHS-R1A, je metabotropní typ receptoru, jehož funkce je spojená s G-proteinem. Jeho aktivace vede k uvolnění kalcia z endoplazmatického retikula do cytoplazmy buňky a následně k depolarizaci membrány (Jenšovský et al. 2000). Vzhledem k existenci takto specifického receptoru se předpokládalo, že tento receptor bude mít i nějaký přirozený endogenní ligand. Rozsáhlý výzkum založený na sledování změn hladin intracelulárního kalcia po přidávání jednotlivých typů tkání ukázal, že největší změny jsou pozorovány po přidání extrahované tkáně ze žaludku. (Kojima et al., 1999).



Obr. 6 Působení orexigenních hormonů v CNS (Narayanan et al. 2010)

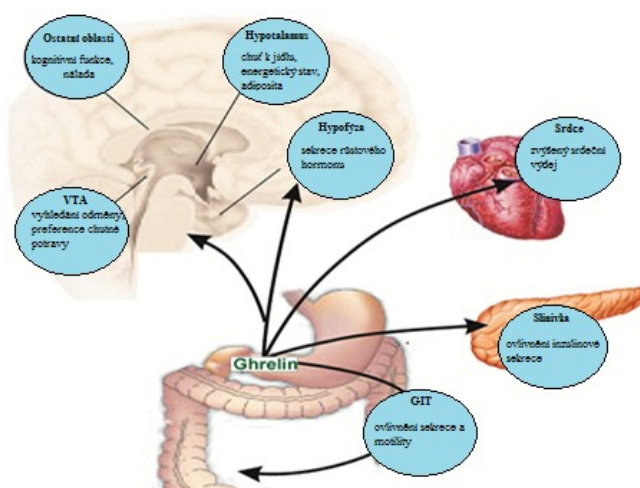
Ghrelin je peptid složený z 28 aminokyselin (Bednarek et al., 2000). Ačkoliv se lidský i potkaní ghrelin od sebe liší dvěma aminokyselinami, v obou případech je pro tento peptid charakteristická oktanylesterová skupina na serinu v poloze 3. Acylovaná forma peptidu je pro většinu účinků ghrelinu zásadní (acylovaný/aktivní ghrelin)(Kojima et al., 1999).



Obr. 7. Působení ghreluinu v lidském organismu (dle Müller et al, 2015)

Přítomnost ghreluinu byla prokázána v různých centrálních (viz. obr. 6) i periferních (viz. obr. 7) strukturách lidského i zvířecího organismu, včetně potkanů, kde byla situace probádána nejpodrobněji. Jako největší zdroj ghreluinu byly označeny endokrinní buňky gastrointestinálního traktu, ale tvoří se i v jiných strukturách, včetně hypothalamu. Buňky gastrointestinálního traktu produkující ghrelin byly označeny jako ghrelinové buňky (Gr cells) a jejich populace v žaludeční sliznici je okolo 20%. Dále jsou obsaženy i v jiných částech gastrointestinálního traktu, v pyloru a tenkém střevě (Date et al., 2000b). Sekrece ghreluinu je řízena lokálními i centrálními stimuly, jako jeden z příkladů stimulů lze uvést glukózový roztok (Rosická et al., 2002). V pokusech na potkanech bylo prokázáno, že jak periferní, tak intracerebrální aplikace ghreluinu vede ke stimulaci sekrece růstového hormonu ze somatotropních buněk hypofýzy (Date et al., 2000a). Dále bylo prokázáno, že jak periferní tak centrální aplikace ghreluinu vyvolává výraznou orexigenní odpověď, tedy zvyšuje žaludeční sekreci, motilitu a motivaci k příjmu potravy. Rychlejší vyprazdňování žaludku je spojeno se

zvýšeným příjmem potravy a tedy i se vznikem obezity (Masuda et al., 2000). Dále se zjistilo, že chronická stimulace receptoru GHS-R1A ghrelinem (Tschöp et al, 2000) nebo syntetickým sekretagogem růstového hormonu (Lall et al, 2001) vedly k navýšení tukové tkáně u hlodavců. Hladiny ghreluinu jsou zvýšené před jídlem (Cummings et al., 2001) a ukázalo se, že korelují s pocity hladu (Cummings et al., 2004). Orexigenní efekt ghreluinu byl pozorován po aplikacích do jednotlivých částí mozku jako je hypothalamus, nucleus tractus solitarius, ventrální tegmentální oblast (VTA) a nucleus accumbens (NAc)(Egecioglu et al., 2010) (viz obr. 8). Ovlivnění mesolimbických center (VTA a NAc) důležitých pro centrální odměňovací procesy je zásadní pro motivaci vyhledávání potravy především energeticky hodnotné a chutné, přinášející odměnu a uspokojení. GHS-R1A receptory se vedle mozkových struktur řídících příjem potravy z hlediska energetické bilance nacházejí i ve strukturách mozkového systému odměny (VTA, NAc apod.). Chronické přejídání může navodit obdobné neuroadaptační změny v mozku jako závislost na návykových látkách, alespoň co se odměňovacích mechanismů týče (Grigson, 2002). Také změny v chování vykazují obdobné znaky u chronického přejídání i u závislostí na návykových látkách, např. ztráta kontroly nad svým jednáním. Na těchto souvislostech byl založen předpoklad, že se princip ghrelinových mechanismů možná uplatňuje i při rozvoji závislostí na návykových látkách.



Obr. 8 Schéma působení ghreluinu v mozku, srdci a slinivce (dle guidetopharmacology.org, 2019)

Ghrelín aplikovaný do VTA i periferně, stimuluje mesolimbický dopaminergní systém (Jerlhag, 2008). Aplikace ghreluinu do VTA vede ke zvýšení hladin dopaminu v NAc (Jerlhag et al., 2007), zvýšenému příjmu jídla a rozvoji chování vedoucího k vyhledávání chutného jídla (Egecioglu et al, 2010) a také ke zvýšení příjmu alkoholu (Jerlhag et al, 2009). Potlačení centrální ghrelinové signalizace různými způsoby vede k utlumení chování směřujícího

k vyhledání odměny, například chutné potraviny (Dickson et al, 2011). Dickson předpokládá, že centrální ghrelinový signalizační systém je úzce propojen s dopaminergními neurony ve VTA a tím se podílí na odměňovacích mechanismech spojených s takovými stimuly jako je jídlo, alkohol a další návykové látky. Z toho vyplývají pozorované podobnosti mezi poruchami příjmu potravy, jako je přejídání se, a závislostmi na návykových látkách (Anzengruber et al, 2006). Lze předpokládat, že na vzniku rozdílných závislostí se pravděpodobně podílí některé obdobné mechanismy a centrální ghrelinová signalizace hraje v těchto procesech velmi důležitou roli (Dickson et al, 2011). V posledních letech bylo zjištěno, že GHS-R1A se významně podílí na přejídání se (Egecioglu et al, 2010), na odměňovacích a posilovacích účincích alkoholu (Jerlhag et al, 2009), amfetaminu a kokainu (Jerlhag et al, 2010) a nikotinu (Jerlhag and Engel, 2011). Vědecké studie v této problematice jsou shrnuty v již zmíněných literárních souhrnech (Engel et al, 2014; Panagopoulos et al, 2014; Koopmann et al, 2018). Největšího pokroku dosáhl výzkum účasti ghrelinových mechanismů v alkoholové závislosti. Vybraný inverzní agonista GHS-R1A, látka PF-5190457, je v současné době testována v pilotní klinické studii u závislých na alkoholu. Jako nadějně lze označit i výsledky našich vlastních studií zaměřených na testování účasti GHS-R1A/ghrelinu v opioidní odměně a v posilovacích účincích opioidů (viz níže)(Lee et al, 2018). Celkově tyto studie upozorňují na nový mechanismus, jež se uplatňuje v neuronálních procesech, které jsou součástí závislostního chování. Blokování ghrelinového receptoru GHS – R<sub>1A</sub> by tak mohlo být potenciální novou strategií v léčbě více typů závislostí.

### **3.2. Shrnutí dalších výsledků získaných na našem pracovišti – v Ústavu farmakologie 3. LFUK**

Pracoviště školitelky, Ústav farmakologie 3. LF UK, se problematikou účasti ghrelinu/GHS-R1A v závislostních mechanismech řadu let intenzivně zabývá a tohoto výzkumu jsem se po dobu svého studia v celé jeho šíři aktivně účastnila. Výzkum byl zaměřen především na účast GHS-R1A a ghrelinu v mechanismech opioidní závislosti, dále v mechanismech závislosti na metamfetaminu (zaměření mého PGS studia) a nově u kanabinoidů. Dosažené výsledky významně přispěly k poznání studovaných vztahů, jsem spoluautorkou pěti publikací s IF zabývajících se touto problematikou. Protože výzkum uplatnění ghrelinu/GHS-R1A v mechanismech opioidní a kanabinoidní závislosti není náplní mé dizertační práce, jen stručně shrnuji nejdůležitější dosažené výsledky, již publikované nebo přijaté k publikaci, na kterých jsem se podílela. V neurobehaviorálních studiích u potkanů jsme zjistili, že antagonist GHS-R1A látka JMV 2959 (triazolový derivát) hraje

významnou roli v odměňovacích i posilovacích účincích morfinu (nespecifický opioidní agonista) i fentanylu (specifičtější  $\mu$ -opioindní agonista). Poprvé jsme u potkanů prokázali, že ghrelinový antagonismus snížil intravenózní auto-aplikaci, resp. spontánní příjem opioidu (fentanylu) a snížil i vyhledávání fentanylu po období vynucené abstinence, tedy snížil tendenci k relapsu. GHS-R1A antagonist JMV2959 snížil rozvoj/navození i projev/expresi morfinem i fentanylem podmíněné preference místa (CPP). GHS-R1A antagonismus snížil opioidy (morfin, fentanyl) navozené vyjití dopaminu i dopaminergní senzitivizaci v NAc, což naznačuje mechanismus předcházejících pozorovaných účinků. Poprvé jsme také zjistili významnou interakci mezi systémy ghreluinu resp. GHS-R1A, endokanabinoidů (anandamid, 2-arachidonoyl glycerol), gama-aminomáselné kyseliny (GABA), opioidů ( $\mu$ -receptor) a dopaminu v důležitých mozkových strukturách odměny, v NAc a ventrální tegmentální oblasti (VTA). Lze tedy předpokládat, že se ghrelin resp. GHS-R1A významně podílí na dopaminergních i na dopaminu nezávislých mechanismech opioindní odměny. Premedikace JMV2959 také významně ztlumila projevy opioidy vyvolané behaviorální stimulace a stereotypního chování a snížila i morfinem navozenou behaviorální senzitivizaci. Naše výsledky podporují další výzkum ghrelinového antagonismu jako potenciálního nového terapeutického směru u opioindní závislosti. (Jerabek et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2014; Sustkova-Fiserova et al. 2016; Sustkova-Fiserova 2019 (v tisku)).

### **3.3. Úloha ghreluinu v mechanismech závislosti na stimulantech amfetaminového typu**

Dosud dostupná data z animálních modelů naznačují, že ghrelin a GHS-R1A hrají v odměňovacích účincích některých stimulantů významnou úlohu (Panagopoulos et al. 2014; Wellman et al. 2013).

Systémová i intracerebrální aplikace ghreluinu (do VTA) zvýšila kokainem navozenou hyperlokomoci a CPP u potkanů (Davis et al. 2007; Wellman et al. 2011; Wellman et al. 2008). Farmakologická antagonizace i genová ablace GHS-R1A u myši snížila lokomotorickou stimulaci a behaviorální senzitivizaci vyvolanou kokainem (Abizaid et al. 2011; Clifford et al. 2012; Wellman et al. 2013). Podání JMV2959 významně u myši snížilo behaviorální stimulaci, CPP i vyjití dopaminu v NAc po aplikaci kokainu (Jerlhag et al. 2010) i nikotinu (Jerlhag and Engel 2011).



Jako ostatní psychostimulanty, samotný amfetamin zvyšuje motorickou pohybovou aktivitu myši, extracelulární hladiny dopaminu v NAc a navozuje drogou/látkou podmíněnou preferenci místa. Jerlhag et al. (2010) ve své práci u myši dokládá, že podání antagonisty receptoru GHS-R1A látky JMV2959 v dávce 6mg/kg aplikované vždy deset minut před amfetaminem snížilo u myši schopnost amfetaminu zvyšovat motorickou aktivitu, hladiny dopaminu v NAc i amfetaminem podmíněnou preferenci místa (Jerlhag et al., 2010). Subchronická blokáda GHS-R1A pomocí JMV2959 také snížila amfetaminem navozenou lokomotorickou stimulaci u myši (Suchankova et al. 2016).

Zatím je jen velmi málo klinických studií, které zkoumají spojitosti mezi ghrelinovým systémem a závislostí na amfetaminech. Studie prováděná ve švédské populaci závislých prokázala souvislost mezi alelou pro GHSR rs2948694 SNP a závislostí na amfetaminu (Suchankova et al 2013b, Panagopoulos et Ralevski, 2014). Naproti tomu studie prováděná v korejské populaci závislých neprokázala žádnou souvislost mezi polymorfismem na Leu72Met GHRL a závislostí na metamfetaminu, ale potvrdila korelaci s emočními problémy, jež jsou spojené se závislostí, jako je deprese nebo úzkost a strach (Panagopoulos et Ralevski, 2014).

#### 4. Závislost a deprese

Deprese je psychické onemocnění, které patří mezi afektivní poruchy. Dle mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) se řadí mezi **Poruchy duševní a poruchy chování, afektivní poruchy (poruchy nálady, F30-F39)**. Vedle depresivních poruch se řadí mezi afektivní poruchy také bipolární porucha, která je charakteristická střídáním manické a depresivní fáze. Pro obě poruchy je charakteristické extrémní a nepřiměřeně přehnané vyjádření nálady. Vlastní depresivní porucha se projevuje opakujícími se epizodami dysforie a negativních myšlenek, což se pak odráží i na samotném chování jedince (Meyer et Quenzer, 2005). Klinicky častou komorbiditou psychiatrických onemocnění jako je deprese bývá například závislost na návykových látkách (Testa et al, 2013). Jako vysvětlení se nabízí užívání návykových látek ke zvládnutí depresivních stavů. Pacient se užíváním návykových látek snaží zmírnit monoaminergní deficit, který je typický pro depresivní poruchy (Ruda-Kucerova et al, 2015). U těchto tzv. duálních diagnóz se však velmi obtížně určuje, zda pacient opravdu řešil depresivní poruchu pomocí návykových látek, či se depresivní porucha objevila až jako důsledek užívání návykových látek (Testa et al., 2013). V každém případě

Testa upozorňuje na významně vyšší výskyt závislosti na návykových látkách mezi pacienty s předchozí psychiatrickou diagnózou než mezi lidmi bez předchozího psychického onemocnění (Testa et al., 2013). Rozvoj psychiatrického onemocnění i závislosti na návykových látkách může být ovlivněn řadou vnějších faktorů, které jsou v obou případech společné (sociální, ekonomické a rodinné prostředí, traumatické události apod.)(Testa et al., 2013). Jako vysvětlení duální diagnostiky deprese a závislosti je všeobecně akceptována hypotéza o samoléčení (Hall and Queener, 2007). To vysvětluje zneužívání drog jako pokus pacienta zmírnit monoaminergní deficit typický pro depresi. Toto bylo klinicky potvrzeno u nikotinu (Holma et al. 2013), metamfetaminu (McKetin et al. 2011) a dalších látek. Přibývají důkazy, že jak deprese, tak i závislost jsou založeny na poruchách neurobiologických regulací, které jsou společné pro depresi a abstinční syndrom (Markou et al. 1998). Hlavními neurobiologickými regulacemi účastnících se těchto procesů jsou dopaminergní (DA)(Nestler a Carlezon 2006), serotoninergní (5-HT), noradrenergní (NA), cholinergní (Zellner et al. 2011), glutamatergní (Tzschentke 2002) a GABAergní systém (Koek et al. 2013).

## **5. Experimentální modely využívané k výzkumu závislostí na návykových látkách a deprese**

### **5.1. Experimentální modely využívané při výzkumu závislosti na návykových látkách**

K pochopení mechanismů vedoucích k závislostnímu chování a sledování konkrétních reakcí na podanou látku slouží řada experimentálních obecně užívaných neuro-behaviorálních metod a specifických modelů závislosti, které jsou používány v preklinickém výzkumu nejčastěji na potkanech a myších.

#### *5.1.1. Behaviorální metody*

Jedná se o soubor experimentálních metod, které sledují změny chování zvířete v závislosti na podané látce, stresu, změně prostředí atp. Vzhledem k tomu, že návykové látky mění chování jedince, behaviorální metody jsou ve výzkumu drogových závislostí hojně využívány. Mezi základní nejčastěji monitorované typy chování patří spontánní aktivita zvířat, strach, úzkost, sociální chování, učení a paměť. Jedná se o sledování specifických projevů chování jedince v určité modelové situaci. Behaviorální metody lze dále rozdělit na metody, které sledují pohybovou aktivitu zvířat v domácí kleci nebo v testu otevřeného pole

atp. Dále pak na metody, které sledují změny v tělesné rovnováze a pohybové koordinaci, například rotarod, pozorování otisků tlapek na podložce atp. Další skupinou behaviorálních metod jsou metody zaměřené na testování učení a paměti. Jsou to „prostorové“ testy (Morrisovo vodní bludiště) a testy „neprostorové“, zaměřené pouze na paměť a učení, například rozpoznání nového objektu. Mezi behaviorální testy se řadí i metody zaměřené na sociální chování zvířat (test sociální interakce, rezident/intruder test, atp.) a testování strachu a úzkosti (pohyb v otevřeném poli nebo na vyvýšeném bludišti ve tvaru plus, snímání ultrasonické averzivní vokalizace, atp.) K testování deprese slouží například test nuceného plavání, test preference sladkého roztoku, model „bulbektomie“, model sociální interakce - rezident/intruder test atp. (viz dále)(Carter et Shieh, 2010). V adiktologii se často monitoruje spontánní aktivita zvířat ovlivněná návykovou látkou/drogou, jež se typickým způsobem mění chování zvířat zejména při opakovaném podávání nebo při vysazení a opětovné aplikaci atp. Jde např. o projevy stereotypního chování, senzitivizace, abstinенční příznaky. Využívá se k tomu většinou test „open field“ (otevřené pole), kdy je sledována pohybová aktivita zvířat v definované aréně pomocí fotobuněk či videokamery. Tyto automatické záznamy bývají doplněny monitoringem různých typických prvků chování charakteristických pro danou drogu, např. stereotypní olizování, usilovné žvýkání, kývání hlavou, stereotypní čenichání, a abstinенční symptomy jako třes hlavy, třes tlapek, zježená srst, „oklepávání se morkého psa“, okusování tlapek a jiné. My jsme v naší studii výhodně spojili monitorování změn prvků v chování potkanů s mikrodialýzou in vivo (viz dále). Dále lze využít specifické experimentální modely.

#### 5.1.2. *Speciální modely používané v adiktologii*

Jedná se o metody, které vychází z přímého vlivu látky/drogy na organismus a studují především specifické závislostní projevy, například aktivní vyhledávání látky/drogy zvířetem a spontánní konzumace látky, preference místa spojeného s aplikací látky a podobně. Z těchto metod jsou nejpoužívanější právě „látkou podmíněná preference místa“ a metoda „autoaplikace“ látky (podrobněji viz níže). Metodou auto-aplikace může být látka přijímána orální, intragastrickou, intramuskulární, intracerebroventrikulární, intrakraniální, pulmonální nebo intravenózní cestou. Nejčastěji se v dnešní době využívá auto-aplikace orální (např. u alkoholu) a intravenózní (u injekčně aplikovaných látek/drog jako je metamfetamin, amfetamin, opioidy, ale často se využívá i u kokainu). Často užívaná je také metoda rozpoznávání drogy (DeSousa et Vaccarino, 1998).

### 5.1.3. *Neurobiologické metody*

Jde o techniky obecně využitelné v neurovědeckých odvětvích. K metodám často užívaných k monitorování neuronální aktivity *in vivo* patří například elektrofyzilogické techniky nebo *in vivo* mikrodialýza (Carter et Shieh, 2010; Pushkina, Sustkova-Fiserova, 2014). *In vivo* mikrodialýza je unikátní neurochemická metoda, která umožňuje sledovat změny v extracelulárních koncentracích neurotransmiterů, hormonů, peptidů a dalších působků ve vybrané mozkové struktuře u experimentálního volně se pohybujícího zvířete v průběhu času. Například lze sledovat neurochemické změny jako reakci na aplikaci určité látky, vystavení zvířete stresu, sociální interakci atp. (Carter et Shieh, 2010). Na základě principu velmi pomalé difuze, pomocí kanyly s polopropustnou/semipermeabilní membránou implantované do mozkové struktury zvířete, se odebírají vzorky mikrodialyzátů v pravidelných časových intervalech. Tyto vzorky jsou pak následně analyzovány pomocí citlivých metod jako je například HPLC s elektrochemickým nebo hmotnostním spektrometrem (Carter et Shieh, 2010).

## 5.2. Experimentální modely deprese

Pro výzkum deprese se využívají takové modely, při kterých jsou vytvořeny podmínky pro vystavování zvířete mírnému většinou chronickému stresu, vyvolání naučené bezmoci atp. (Carter et Shieh, 2010). Validní model deprese musí vykazovat dobrou citlivost vůči klinicky ověřeným antidepresivům, jako jsou tricyklická antidepresiva, inhibitory monoaminoxidázy či selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (Treit et Menard, 1998).

V modelech založených na natrénování stresové reakce je zvíře vystaveno stresu, na který nejprve reaguje bojem, snahou o záchranu a vyproštění. Tato úniková a obranná aktivita je následována nehybností, která je chápána jako znak deprese. Mezi takovéto modely patří například *nucené plavání* nebo *test zavěšení zvířete za ocas*. Dalším možným modelem je vystavení zvířete opakovanému *mírnému chronickému stresu*. Může jít o deprivaci způsobenou nedostatkem stravy a tekutin, změny v nastaveném světelném cyklu, blikající osvětlení, nakloněné či znečištěné klece atp. Stresovou situací může být např. i frustrující sociální interakce, kdy je zvíře opakovaně umísťováno do blízkosti agresivního jedince stejného nebo jiného zvířecího druhu. Agresivní jedinec bezdůvodně útočí na stresované zvíře třeba při obraně svého teritoria („intruder test“). Dále se užívají modely deprese založené na tradičních schématech učení. Jedním z nich je *naučená bezmoc*, kdy zvíře je nejprve

vystavováno stresové situaci, ze které nemá možnost úniku. Později je v obdobné situaci již umožněn únik, avšak zvíře tuto možnost nevyužívá (Treit et Menard, 1998).

Stresorem, který navodí chování se znaky deprese, může být i neurologický zásah v podobě *bulbektomie čichového laloku*. Zvířata po tomto chirurgickém zákroku vykazují různé změny chování indikující depresivní poruchu (zvýšená dráždivost při dotyku, hyperaktivita v testu „open field“, snížený zájem o sladký/glukózový roztok atp.)(Treit et Menard, 1998). Metodu bulbektomie jsem použila ve své studii a bude podrobněji popsána níže mezi použitými metodikami.

## 6. Cíle a hypotézy výzkumné práce

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na výzkum závislostních mechanismů u metamfetaminu. Na základě dosavadních publikovaných výsledků zkoumání vztahů ghrelinu a jiných návykových látek, který je sumarizovaný v úvodní části práce, jsem chtěla zjistit, zda ghrelinový antagonismus ovlivní účinky metamfetaminu ve vybraných závislostních modelech u potkanů. Dále jsem se zaměřila na výzkum případných změn koncentrací neuromediátorů, které zprostředkovávají odměnu v oblasti nucleus accumbens (NAc), v potkaním modelu deprese. Sledovala jsem i vliv deprese na neuromediátorové změny vyvolané metamfetaminem v NAc, které by mohly přispět k bližšímu poznání vztahů mezi závislostí a depresí.

1. Cílem předkládané dizertační práce bylo otestovat hypotézu, že premedikace ghrelinovým antagonistou, látkou JMV2959 sníží intravenózní selfadministraci (IVSA) metamfetaminu u potkanů.

2. Součástí hypotézy byl i předpoklad, že premedikace JMV2959 bude snižovat také vyhledávání metamfetaminu po období vynucené abstinence, tedy tendenci k relapsu IVSA metamfetaminu u potkanů.

3. Dalším cílem bylo otestovat vliv premedikace látkou JMV2959 na metamfetaminem podmíněnou preferenci místa (CPP). Naší hypotézou bylo, že premedikace JMV2959 sníží projev i navození CPP u metamfetaminu.

4. Dále jsme chtěli zjistit a popsat neuromediátorové změny, k nimž dochází v nucleus accumbens v modelu deprese, tedy po bulbektomii čichového laloku u potkanů. Naší hypotézou bylo, že navozené depresivní chování bude spojené s významnými změnami v extracelulárních hladinách mediátorů dopaminu a jeho 3 hlavních metabolitů, serotoninu a metabolitu, glutamátu a gamaaminomáselné kyseliny (GABA). NAc je mozkovou strukturou zásadní pro pocit odměny a iniciaci závislostních mechanismů.

5. Dále jsme chtěli otestovat hypotézu, že model deprese významně ovlivní u potkanů neuronální citlivost/reaktivitu k aplikaci metamfetaminu v oblasti nukleus accumbens. Předpokládali jsme tedy, že pozorované neuromediátorové změny se budou významně lišit od účinku metamfetaminu u ne-bulbektomovaných potkanů.

## 7. Použité metodiky

### 7.1. Zvířata použita v experimentech

Ve všech níže popisovaných experimentech jsme pracovali s dospělými potkaními samci kmene Wistar (Velaz, Anlab, Česká Republika) v akreditovaném zvěřinci 3. LFUK za stálých standardních podmínek (při teplotě 22-24°C a vlhkosti 50-60%) a pravidelném střídání světelného cyklu (12h). Před vlastními experimenty byla zvířata vždy v domácích polykarbonátových klecích minimálně po dobu jednoho týdne, kdy s nimi bylo denně manipulováno, aby je následná manipulace v průběhu experimentů nestresovala. V průběhu pokusů zvířata vážila průměrně od 180 do 320 g. V průběhu studie podmíněné preference místa (CPP) byla zvířata umístěna v klecích po třech s neomezeným přístupem k potravě a vodě. V průběhu intravenózní self-administrace (IVSA) byla zvířata v domácích klecích umístěna samostatně především z důvodu prevence vzájemného poškození katetru; denní příjem standardní potravy byl 20g/den s vodou ad libitum. V experimentu zahrnujícím bulbektomii čichových laloků a mikrodialýzu byla zvířata po provedené bulbektomii taktéž v klecích jednotlivě s neomezeným přístupem k potravě a vodě. Experiment IVSA probíhal za převráceného světelného cyklu (12h), tedy v tmavé fázi.

Pro statistické hodnocení dat byly v experimentu CPP vytvořeny skupiny o počtu 8-9 zvířat. Do experimentu IVSA bylo původně zařazeno 26 dospělých potkaních samců. 12 zvířat bylo ve skupině, které byla aplikována látka JMV2959, 8 zvířat bylo v kontrolní skupině (s aplikací fyziologického roztoku). Dvě zvířata z původní skupiny byla z experimentu vyloučena pro nefunkční intravenózní katetr a 4 zvířata nebyla do experimentu zařazena, protože nedosáhla v IVSA minimálního stabilního příjmu metamfetaminu.

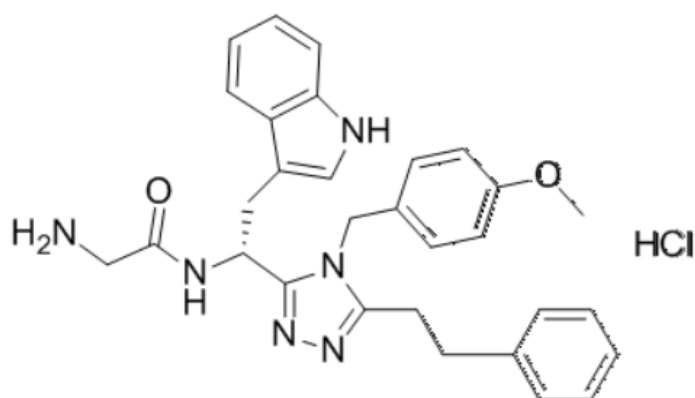
Původně 30 zvířat bylo užito pro experiment zahrnující bulbektomii čichových laloků s mikrodialýzou. Z důvodu následně odhalené nedokonalé bulbektomie byla tři zvířata z experimentu vyloučena. Následně bylo do experimentu zařazeno 13 falešně operovaných („sham“) zvířat a 14 zvířat po bulbektomii čichových laloků. Z těchto zvířat pak byly utvořeny 4 skupiny:

- falešně operovaná zvířata + aplikace fyziologického roztoku (5 zvířat)
- falešně operovaná zvířata + aplikace metamfetaminu (5mg/kg)(8 zvířat)
- zvířata po bulbektomii + aplikace fyziologického roztoku (6 zvířat)
- zvířata po bulbektomii + aplikace metamfetaminu (5mg/kg)(8 zvířat)

Všechny procedury zahrnující zvířata probíhaly dle mezinárodních zákonů, při dodržení směrnice Evropského parlamentu a rady (86/609/EU, 24. Listopadu 1986), Směrnice EU (2010/63/EU, 22. září 2010) a instrukcí Národního výboru pro péči a používání laboratorních zvířat. Provádění experimentů bylo schváleno Expertní komisí pro ochranu pokusných zvířat 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a bylo v souladu se Zákonem České národní rady na ochranu zvířat proti týrání (246/1992 Sb. 15.dubna 1992).

## 7.2. Použité chemikálie

Metamfetamin hydrochlorid byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich a byl podáván zvířatům v dávce 2 nebo 5 mg/kg intraperitoneálně (i.p.) v objemu 0,1 ml/100 g tělesné hmotnosti zvířete v experimentu CPP a při bulbektomii s mikrodialýzou. Při IVSA byl metamfetamin aplikován v průběhu sezení infuzí v jednotlivých dávkách 0,09 mg/kg/infuzi o objemu 0,1 ml. Antagonistu GHS-R1A ghrelinových receptorů, triazolový derivát (obr. 9), látku s označením JMV2959 poskytl Dr. Anton Beshpalov, Abb Vie, Německo. Látka JMV2959 byla podávána zvířatům v dávkách 1, 3 nebo 6 mg/kg i.p. v objemu 0,1 ml/100 g živé hmotnosti zvířete. Obě látky (metamfetamin hydrochlorid a látka JMV2959) byly rozpuštěné ve fyziologickém roztoku, který byl zároveň použit u kontrolní skupiny při dodržení stejné aplikační cesty.



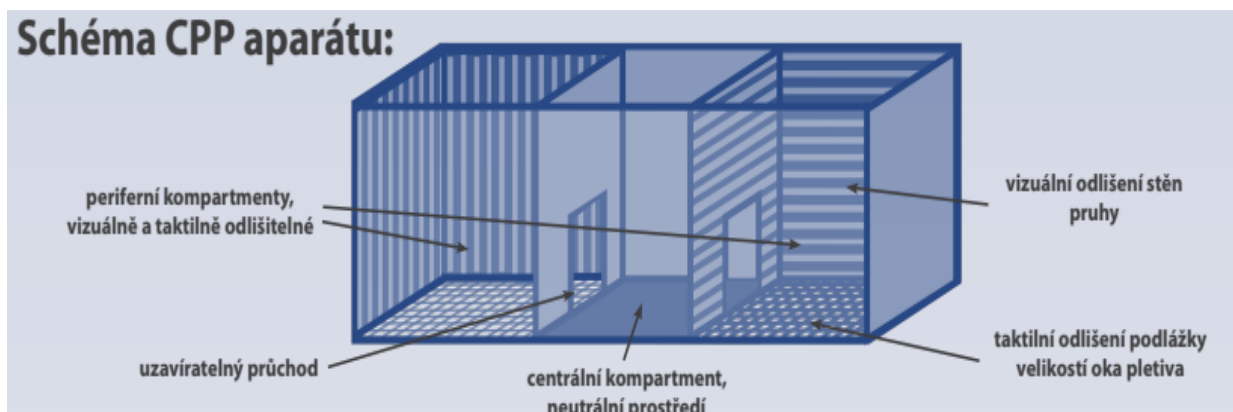
Obr. 9 Struktura molekuly látky JMV2959 (např. dle [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com))

## 7.3. Drogou podmíněná preference místa (CPP)

Podmíněná preference místa (Conditioned place preference; CPP) je animální model hojně využívaný ve výzkumu drogových závislostí. Vychází z principu podmiňování efektu drogy s konkrétním prostředím. Soubor neutrálních prvků prostředí je asociován/podmiňován



s podáváním drogy a u zvířete se vytváří podmíněné spojení příjemných pocitů po aplikaci drogy a původně neutrálních prvků prostředí. Pokud podávaná látka má pozitivně posilující efekt, zvíře aktivně vyhledává prostředí (soubor původně neutrálních prvků), kde mu byla látka aplikována (DeSousa et Vaccarino, 1998; Sanchis-Segura, Spanagel, 2006).



Obr. 10 Schéma pokusné aparatury pro podmíněnou preferenci místa

Pokusná aparatura (viz. Obr. 10) se skládá ze dvou stejně velkých boxů/kompartimentů spojených menší přechodovou komůrkou. Oba stejně velké boxy se liší povrchem podlahy (hrubé/jemné pletivo) a vzhledem stěn (příčné/svislé černé a bílé pruhy). Prostřední přechodový box je neutrálního vzhledu a je z něj možné vstoupit průchody do obou částí. Tyto průchody je možné v případě potřeby uzavřít. Celá aparatura byla v průběhu pokusu osvětlena světlem o síle 45 lux.

Užili jsme tzv. „biased“ uspořádání metody, jež zohledňuje spontánní preferenci zvířat (Jerabek et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2019; Havlíčková et al. 2018). Celý experiment začíná před-expoziční fází, neboli testem přirozené preference prostředí (DeSousa et Vaccarino, 1998). Všechna zvířata jsou umísťována po jednom na dobu 20 minut do středové přechodové komory s otevřenými průchody do obou postranních boxů. 20 minut před umístěním zvířete do boxu byl zvířatům vždy aplikován fyziologický roztok. V průběhu sezení se počítá pomocí fotobuněk počet vstupů a doba strávená v jednotlivých kompartmentech pokusné aparatury. Následuje fáze podmiňování, která probíhá druhý až devátý den experimentu. V této fázi byl denně aplikován každému zvířeti metamfetamin v dávce 2 nebo 5 mg/kg i.p. a zvíře bylo následně umístěno do spontánně nepreferovaného CPP boxu na 40 minut. V druhé polovině dne bylo každé zvíře umístěno do spontánně preferované klece na 40 minut po předchozí aplikaci fyziologického roztoku. Tyto procedury probíhaly vždy jedna dopoledne a druhá odpoledne dle náhodného rozdělení. Během

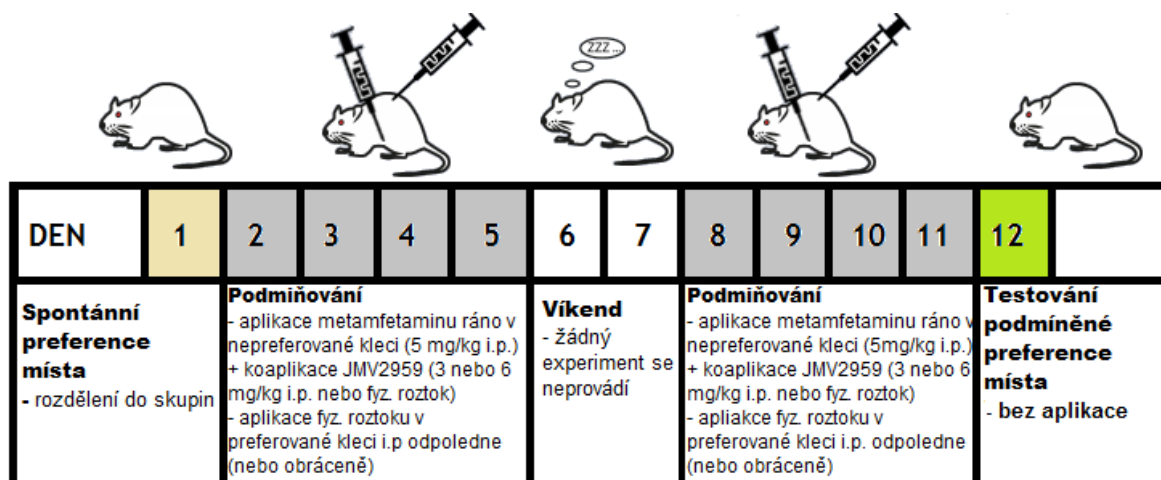
podmiňování byl průchod do ostatních částí CPP aparatury uzavřený. Desátý den experimentu bylo zvíře umístěno do pokusné aparatury opět do středového kompartmentu s otevřenými průchody. Během 20 minut jsme opět sledovali počet vstupů a čas strávený v jednotlivých kompartmentech.

V experimentu jsme zjišťovali vliv ghrelinového antagonisty, látky JMV2959 na metamfetaminem podmíněnou preferenci místa ve dvou různých uspořádáních. V prvním uspořádání (viz. Obr. 11) byl testován vliv antagonisty na již vytvořenou preferenci prostředí spojeného s podmiňováním drogou. Potkanům byl aplikován ghrelinový antagonist (látká JMV2959 v dávce 1 nebo 3 nebo 6 mg/kg i.p. nebo fyziologický roztok) pouze desátý den experimentu 20 minut před umístěním do pokusné aparatury.



Obr. 11 Schéma podmíněné preference místa v uspořádání, kdy byl antagonist JMV2959 podán až při testování již vytvořené vazby (CPP) metamfetaminu s prostředím

Ve druhém experimentálním uspořádání jsme sledovali vliv ghrelinového antagonisty na vlastní proces podmiňování (viz Obr. 12). Potkanům byl aplikován ghrelinový antagonist (JMV2959 3 nebo 6 mg/kg i.p. nebo fyziologický roztok) opakovaně každý den v průběhu podmiňování současně s aplikací metamfetaminu (5 mg/kg i.p.). Každou látku obdrželo zvíře v jiné injekční stříkačce do odlišné strany těla. Dvanáctý den experimentu byla pouze testována preference jednoho z kompartmentů. Tedy zvířata byla postupně umísťována do centrálního kompartmentu aparatury s možností průchodu do všech částí na dobu 20 minut. Byl opět měřen čas strávený v jednotlivých kompartmentech a počet vstupů do každé z nich.



Obr. 12 Schéma podmíněné preference místa v uspořádání, kdy byl antagonist JMV2959 podáván společně s metamfetaminem v průběhu procesu podmiňování s prostředím.

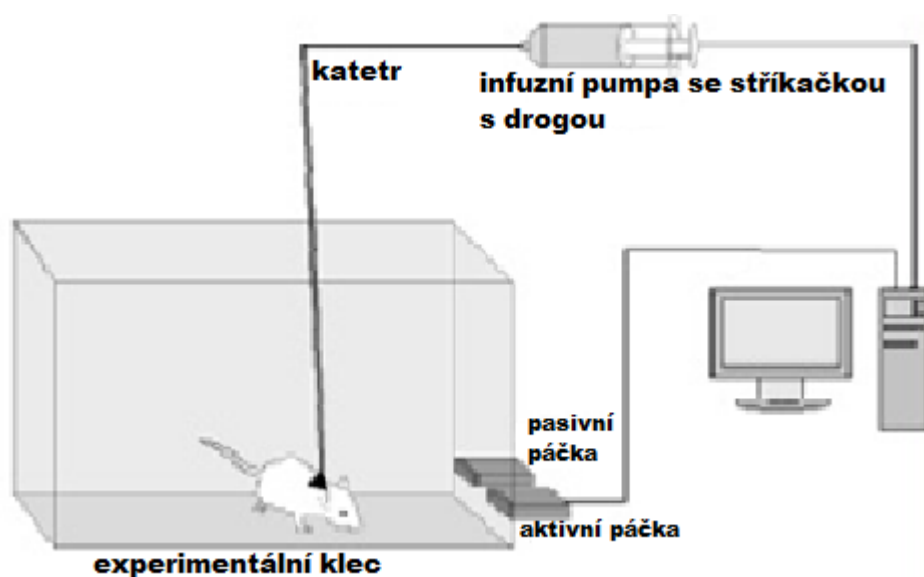
Podmíněná preference místa (CPP) byla vyjádřena jako rozdíl procent z celkového času (20 min) stráveného v kleci spojené s aplikací metamfetaminu (spontánně nepreferovaný kompartment) po podmiňování (10. den) a během před-expozičního sezení (1. den).

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly hodnoceny pomocí jednocestné analýzy rozptylu (one way ANOVA) následované Holm-Shidakovým testem. Z literatury je známo, že samotný fyziologický roztok nepodmiňuje výběr klece CPP, ani samotná aplikace ghrelinového antagonisty JMV2959 nemá na podmíněnou preferenci místa vliv (Jerlhag et al, 2009). Proto jsme tyto experimenty neprováděli.

#### 7.4. Intravenózní autoaplikace (IVSA)

Intravenózní autoaplikace neboli self-administrace (IVSA) představuje na rozdíl od CPP metodu, která přímo měří reakci zvířete na odměňovací účinky návykových látek jako spontánní vyhledávání a konzumaci drogy (DeSousa et Vaccarino, 1998). Zvíře umístěné v pokusné kleci je napojeno přes intravenózní katetr na infuzní pumpu, kterou samo může zapnout pomocí speciální páčky nebo fotobuňky (viz. Obr.13).

Pokusný box je vybavený tlumeným světlem a světelnými kontrolkami signalizujícími právě probíhající děj (probíhající infuzi oznamuje blikání všech barevných kontrollek, připravenou dávku infuze svítící zelená kontrolka nad aktivní páčkou a podobně). V případě potřeby je možné do pokusného boxu umístit speciální podlahku umožňující aplikaci elektrošoků do plosek nohou zvířete, případně lze využít i zvukový signál (tyto možnosti jsme nevyužili).



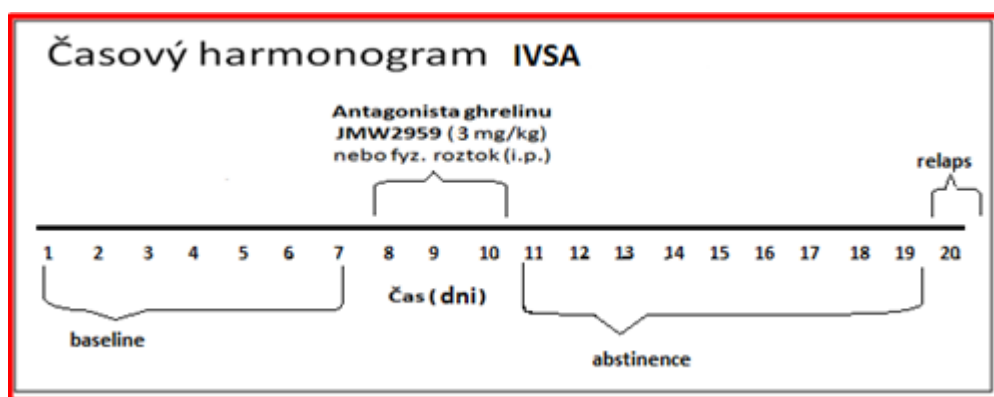
Obr. 13 Schéma aparatury pro intravenózní selfadministraci

V ketamin-xylozinové anestezii (ketamin 100 mg/kg i.p., Narketan; xylozin 10 mg/kg i.p., Xylapan, obojí Vetoquinol) byl potkanům implantován nitrosrdeční katetr. Katetr byl do pravé síně zaveden z podklíčkové oblasti jugulární žilou. Druhý výstup katetru byl podkožím vyveden v oblasti mezi lopatkami zvířete a napojen na bezjehlový vstup uchycený speciálním úvazem ke zvířeti tak, aby ho neomezoval v pohybu a zároveň aby si ho zvíře nemohlo samo sundat či poškodit. Zvířata byla ponechána pět dní v klidu pro potřebnou rekonvalescenci. Katetr byl denně proplachován heparinem a denně jsme aplikovali antibiotikum cefazolin a analgetikum meloxikam. Po rekonvalescenci začala každodenní sezení IVSA. Zvířatům byl i nadále denně proplachován katetr heparinem a fyziologickým roztokem a před každým sezením byla testována průchodnost katetru. Denně byly zaznamenávány změny v chování zvířat a jejich hmotnost. Metoda IVSA je podrobně popsána v našich publikacích (Sustkova-Fiserova et al. 2019; Havlíčková et al. 2018). Zvířata byla denně umísťována na sezení trvající 180 minut do selfadministračních boxů, které byly vybaveny dvěma páčkami na jedné stěně boxu (viz. Obr. 14).



Obr. 14 Potkan mačkájící aktivní páčku v self-administračním boxu

Program ovládající infuzní pumpu byl nastaven tak, že zvíře po každém stisku aktivní páčky dostalo infuzi drogy (vyjma prvních patnácti vteřin bezprostředně po infuzi, tzv. timeout), nastavení označované jako „fixed ratio 1“ (FR1)(Kucerova et al., 2012). Dávka metamfetaminu v infuzi byla 0,09 mg/kg/infuzi/0,1ml. Po ustálení příjmu metamfetaminu (alespoň sedm dní s minimálním příjmem alespoň 12 infuzí v průběhu každého sezení, kdy preference aktivní páčky byla vyšší než 70%) následovaly tři dny sezení, kdy byl zvířatům aplikován i.p. antagonist ghrelinových receptorů (JMV2959) vždy 20 minut před vlastním sezením v dávce 3mg/kg. Kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok (0,1 ml/100g tělesné hmotnosti zvířete, i.p.) taktéž 20 minut před sezením. Po poslední premedikaci byla zvířata 10 až 12 dní umístěna v domácích klecích a pravidelně kontrolována (období vynucené abstinence). Desátý až dvanáctý den byla zvířata umístěna zpět do svých IVSA pokusných boxů na jedno sezení, při kterém již nebyla připojena k infuzní pumpě, takže po stisku aktivní páčky nedostávala žádnou infuzi drogy. V průběhu tohoto sezení jsme sledovali tendenci zvířat k relapsu, resp. vyhledávání drogy/metamfetaminu. Dvacet minut před „relapsovým“ sezením byla opět zvířata premedikována i.p. ghrelinovým antagonistou JMV2959 v dávce 3 mg/kg nebo fyziologickým roztokem 0,1 ml/100g (viz Obr.15). V každém IVSA sezení jsme monitorovali počet stisků aktivní i pasivní páčky a (kromě tendence k relapsu) také počet aplikovaných infuzí během celého tříhodinového sezení (Havlíčková et al. 2018).



Obr. 15 Časový harmonogram intravenózní autoaplikace metamfetaminu a premedikace JMW2959 v akutní fázi závislosti a v modelu relapsu

## 7.5. Bulbektomie čichových laloků a následná mikrodialýza

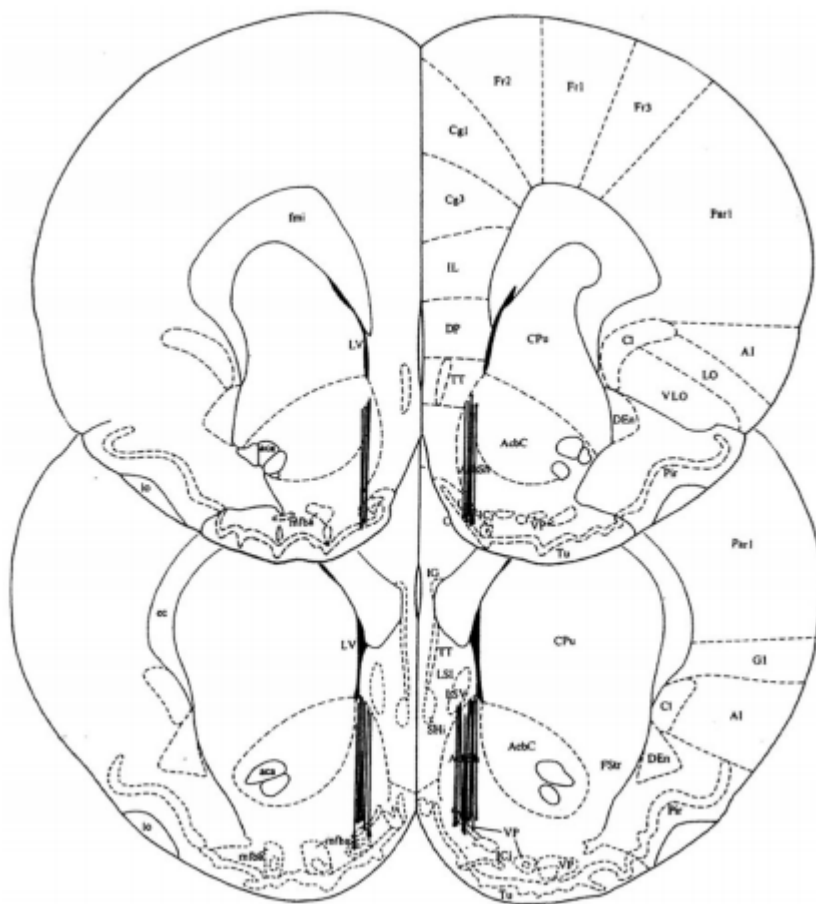
### 7.5.1. Procedura bulbektomie čichových laloků

Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin. V ketamin-xylozinové anestezii (ketamin 50mg/kg i.p., xylozin 8 mg/kg i.p.) byly zvířatům vyvrtány dva otvory do lebky v místě 7 mm před linií bregmy. Čichové laloky byly odsáty a dutina byla vyplněna hemostatickým materiálem, následně byla rána zašita a ošetřena antibakteriálním zásypem (neomycin/bacitracin). Falešně operovaná zvířata (sham) podstoupila všechny procedury shodně kromě odsávání čichových laloků. Následovala třítýdenní rekonvalescence, během které byla zvířata umístěna v domácích klecích jednotlivě. Správné provedení bulbektomie bylo po dokončení experimentu ověřeno histologicky spolu s ověřením umístění mikrodialyzační kanyly (viz dále).

### 7.5.2. In vivo mikrodialýza

Tři týdny po provedené bulbektomii byl zvířatům v ketamin/xylozinové anestezii (ketamin 100 mg/kg i.p., xylozin 10 mg/kg i.p.) implantován vodič pro mikrodialyzační kanylu (MAB4 sondy, Agnathos, Švédsko) pomocí stereotaktického přístroje (StoeltingCo). Vodič pro kanylu byl implantován do nucleus accumbens shell (NAcSh) podle souřadnic vztahujících se k poloze bregmy: A: + 2,0 mm, L: ± 1,2 mm a do hloubky V: 6,2 mm vzhledem k týlní kosti (Paxinos and Watson, 2007). Vodič pro mikrodialyzační kanylu byl pomalu zanořen do požadované hloubky (dle koordinant) a uchycen k lebce zvířete pomocí

zubního cementu a kotvícího šroubku. Po proběhnutí vlastní mikrodialýzy byla správnost zavedení kanyly do NAcSh ověřena histologicky (viz Obr. 16).



Obr. 16 Histologické ověření lokalizace mikrodialyzační kanyly v nukleus accumbens shell. Schéma příkladu lokalizace kanyl u potkanů, u kterých byly analyzovány koncentrace neurotransmiterů (dialyzační oblast kanyly je vyznačena plnými čarami); schéma řezů podle (Paxinos and Watson 2007). Na levé straně každého řezu je uvedena vzdálenost od bregmy (mm).

Vlastní mikrodialýza proběhla 48 hodin po implantaci vodiče pro kanylu. Do vodiče byla umístěna kanyla s polopropustnou membránou, která byla proplachována Ringerovým roztokem při konstantním průtoku 2,0  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Univentor 864 Syringe Pump, Agnethos, Švédsko). Teprve po minimálně 80 minutách, kdy si zvířata zvykala na pokusné klece a vytvořil se rovnovážný vztah mezi obsahy uvnitř kanyly a prostředím okolní mozkové tkáně, jsme začali s odebráním vzorků. Dialyzát jsme jímali ve dvacetiminutových intervalech (objem 40  $\mu\text{l}$ ) do malých polyethylenových zkumavek obsahujících 12  $\mu\text{l}$  HCl 0,1 mM, která zabraňuje rozkladu katecholaminů v dialyzátu. Po třech intervalech sběru vzorků bazálních hodnot extracelulárního obsahu v NAc byl zvířatům intraperitoneálně aplikován metamfetamin (5mg/kg) nebo fyziologický roztok. Vzorky dialyzátu byly dále odebrány ve

dvacetiminutových intervalech po dobu 180 minut od aplikace metamfetaminu. Zkumavky s dialyzátem byly ihned po odebrání zamrazeny na -70 °C. Následně bylo v jednotlivých vzorcích stanoveno množství dopaminu a jeho metabolitů: 3-metoxytyraminu (3-MT), 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC), homovanilinové kyselina (HVA), serotoninu a metabolitu 5-hydroxyindoloctové kyseliny (5-HIAA) pomocí vysoce citlivé kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS) ve spolupráci s pracovištěm Laboratorní a lékařské diagnostiky na VŠCHT. Metoda in vivo mikrodialýzy je podrobně popsána v našich publikacích (Jerabek et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2014; Sustkova-Fiserova et al. 2016; Sustkova-Fiserova et al. 2019).

Zároveň s probíhající mikrodialýzou byly sledovány i změny v chování jednotlivých zvířat, které byly zaznamenávány nezávislým pozorovatelem bez znalosti medikace a rozdělení zvířat do skupin. Byly sledovány změny chování v několika kategoriích:

- imobilita (útlum, přivřené oči, utlumená reakce na podněty z okolí)
- pohyblivost (nestereotypní aktivita, očichávání, čištění, protahování, chůze)
- stereotypní chování (pokyvování hlavou, přežvykování, olizování, stereotypní čenichání)

Monitorované chování bylo zaznamenáváno pro každý dvacetiminutový interval (dle odběru mikrodialyzačních vzorků) zvlášť a vyhodnoceno jako procento času stráveného určitým typem chování.

## **7.6. Statistická analýza**

V případě podmíněné preference místa (CPP) byly spočítány rozdíly v procentech celkové doby strávené v kompartmentu spojeném s dávkou metamfetaminu (spontánně nepreferovaná klec) v průběhu závěrečného sezení a sezení z prvního dne před procesem podmiňování (určení spontánní preference prostředí). Rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí jednocestné analýzy rozptylu (one-way ANOVA) následované Holm-Shidakovým testem (viz Jerabek et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2019; Havlíčková et al. 2018).

V případě intravenózní selfadministrace (IVSA) byly statistické rozdíly mezi skupinami v průběhu času (sled jednotlivých IVSA sezení) vypočteny pomocí dvoucestné analýzy rozptylu pro opakovaná měření (two-way ANOVA RM) následované Bonferroniho testem. Celkové rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA) následované Bonferroniho testem. Rozdíly mezi skupinami v počtu stlačení páčky při sezení testujícím tendenci k relapsu byly vypočteny pomocí Kruskal-Vallis



ANOVA analýzy rozptylu následované Dunnovým testem (viz Sustkova-Fiserova et al. 2019; Havlíčková et al. 2018).

Pro statistické vyjádření rozdílů v bazálních hladinách neurotransmiterů v NAcSh mezi skupinou zvířat po bulbektomii (OBX) a skupinou zvířat „sham“ byla použita jednocestná analýza rozptylu (one-way ANOVA) následovaná Bonferroniho t-testem. Hodnoty extracelulárních koncentrací neurotransmiterů po premedikaci metamfetaminem/fyziologickým roztokem v průběhu celé mikrodialýzy byly přepočteny na procenta bazálních hladin (průměr prvních tří odebraných vzorků bazálních hladin) a následně statisticky vyhodnoceny pomocí dvoucestné analýzy rozptylu pro opakovaná měření (two-way ANOVA RM) následované Bonferroniho t-testem (viz Havlíčková et al. 2018).

Veškeré statistické testování bylo prováděno na hladině významnosti 0,05 (P hodnoty <0,001, <0,01, <0,05 definovaly úroveň statistické významnosti). Všechny výsledky jsou prezentovány jako průměry v rámci skupin +/- SEM (standardní/střední chyba průměru). Podrobnosti statistických hodnocení jsou uváděny v publikovaných článcích, zde uvádím pro přehlednost pouze výsledné hladiny významnosti (P)(Havlíčková et al. 2018; Rudá-Kučerová et al. 2015)

## 8. Výsledky

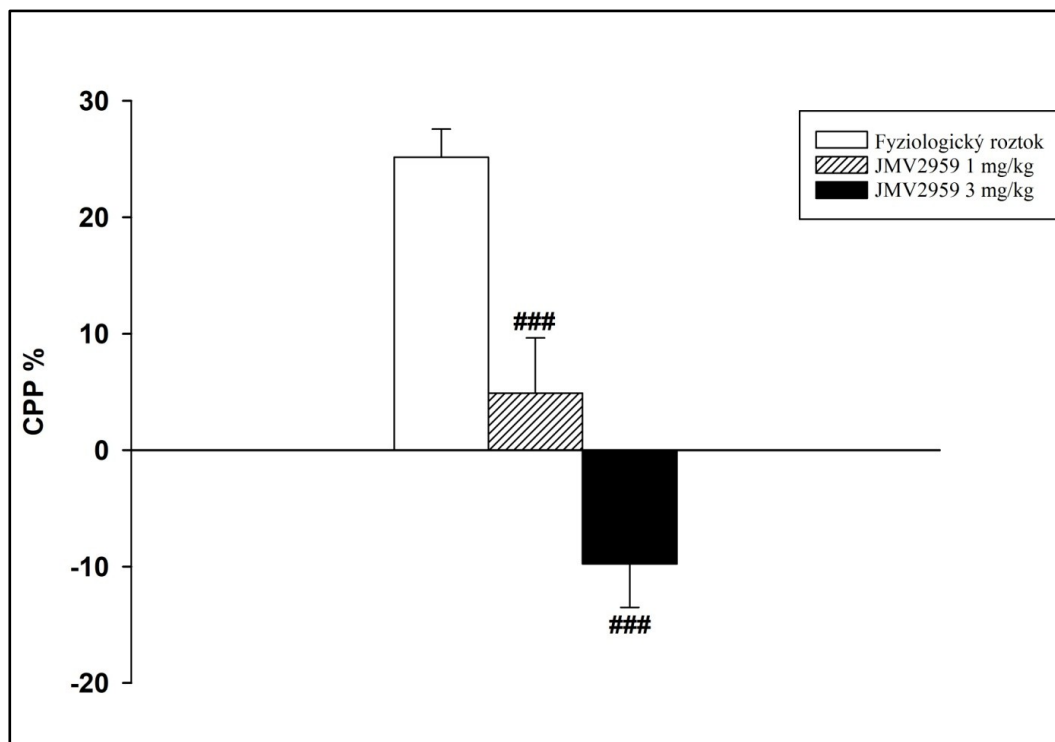
### 8.1. Metamfetaminem podmíněná preference místa (CPP)

Výsledky studie CPP jsou podrobně popsány v Havlíčková et al. 2018. V obou experimentálních uspořádáních CPP se projevila metamfetaminem podmíněná preference místa. U nižší zvolené dávky metamfetaminu (2 mg/kg i.p.) byl zřejmý výraznější podmiňovací efekt, tedy nižší zvolená dávka se jevila jako více odměňovací.

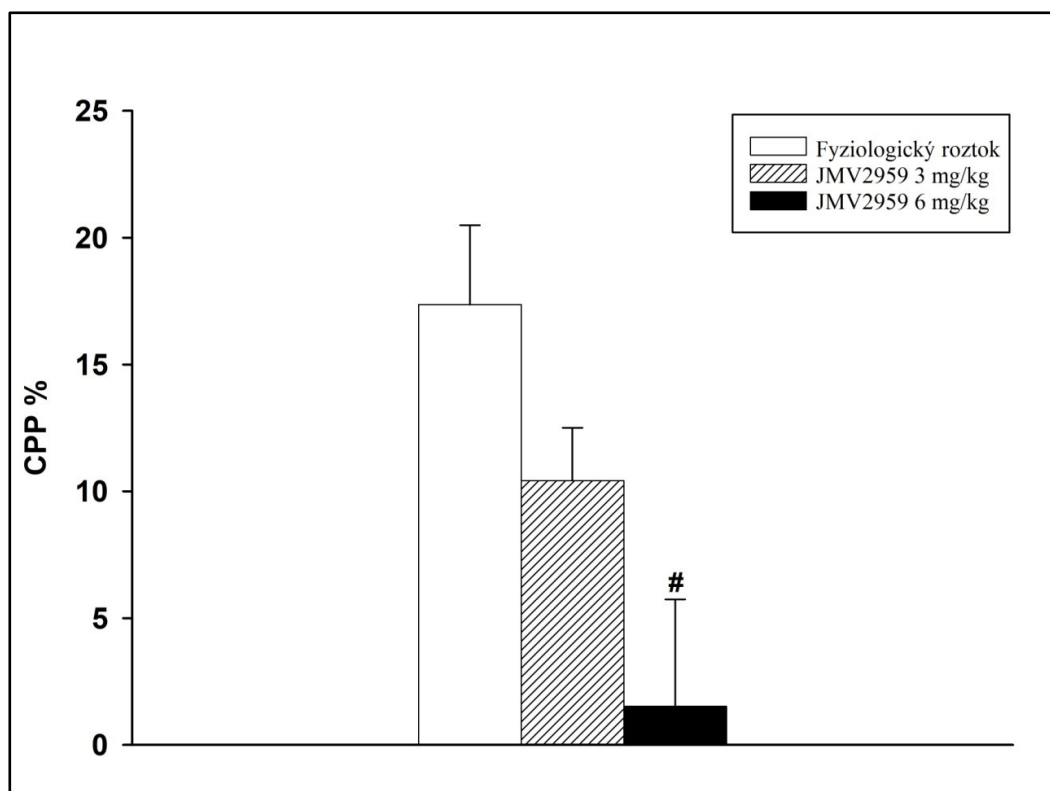
#### 8.1.1. *Vliv ghrelinového antagonismu na projev metamfetaminem podmíněné preference místa*

Ghrelinový antagonist, látka JMV2959, byl zvířatům aplikován vždy 20 minut před závěrečným experimentálním sezením po proběhlém podmiňování. Projevy metamfetaminem podmíněné preference místa (CPP) byly statisticky významně (### P<0,001, resp. # P<0,05) a na dávce závisle sníženy a to jak u podmiňování metamfetaminem v dávce 2 mg/kg (viz. Obr.

17), tak i v dávce 5 mg/kg (viz. Obr. 18). Efekt jednotlivých dávek ghrelinového antagonisty (1 a 3 mg/kg JMV2959 i.p.) byl výraznější u CPP navozené dávkou 2 mg/kg metamfetaminu.



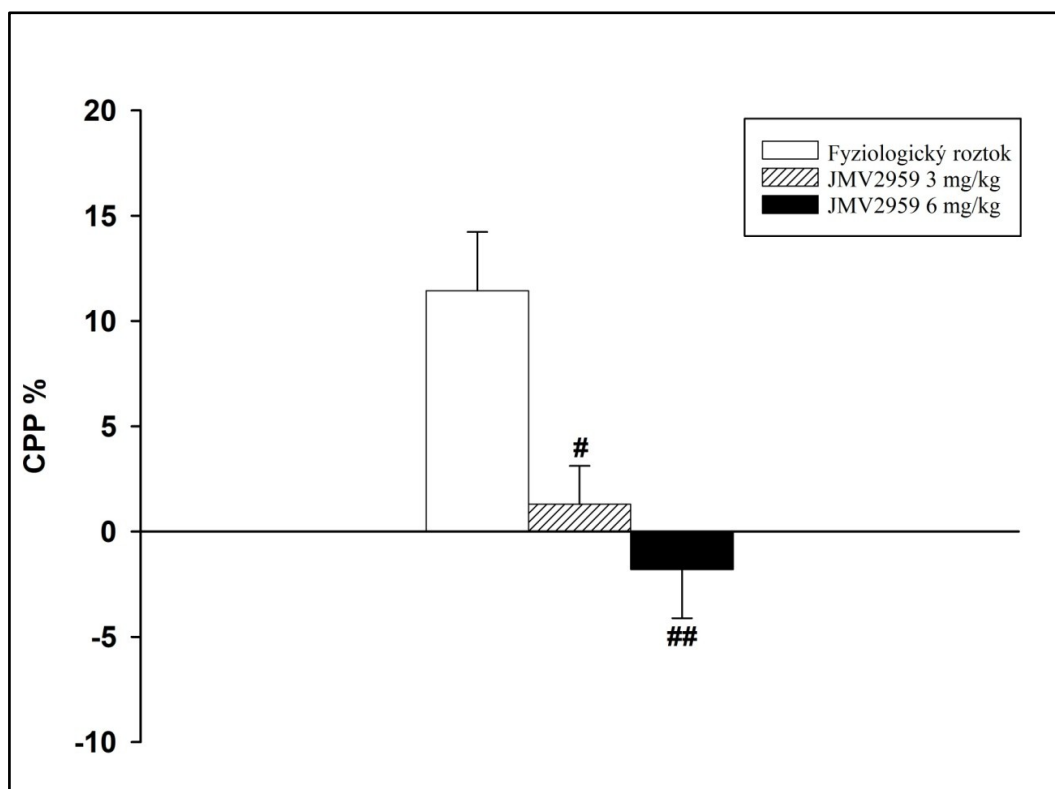
Obr. 17 Grafické vyjádření změn u podmíněné preference místa (CPP), kdy byla látka JMV2959 podána zvířatům 20 minut před závěrečným sezením po proběhlém podmiňování **metamfetaminem v dávce 2 mg/kg**.. Vyjádřeno jako rozdíl procent času stráveného ve spontánně nepreferované kleci po podmiňování a před podmiňováním. Vlastní efekt premedikace JMV2959 oproti kontrolní skupině je vyjádřen jako ###  $P < 0,001$ .



Obr. 18 Grafické vyjádření změn u podmíněné preference místa, kdy byla látka JMV2959 podána zvířatům 20 minut před závěrečným „po-podmiňovacím“ sezením po podmiňování **metamfetaminem v dávce 5 mg/kg**. Vyjádřeno jako rozdíl procent času stráveného v původně nepreferované kleci po podmiňování a před podmiňováním. Vlastní efekt premedikace JMV2959 oproti kontrolní skupině je vyjádřen jako #  $P < 0,05$ .

#### 8.1.2. Vliv ghrelinového antagonismu na průběh podmiňování metamfetaminem

Když byl ghrelinový antagonist JMV2959 (v dávce 3 nebo 6 mg/kg i.p.) zvířatům aplikován denně během podmiňovacích sezení vždy spolu s metamfetaminem (5mg/kg i.p.)(viz. Obr. 19), pozorovali jsme významné a na dávce závislé snížení navozené asociace metamfetaminu s prostředím, tedy snížené navození CPP.



Obr. 19 Grafické vyjádření změn u podmíněné preference místa, kdy byla látka JMV2959 (v dávkách 3 nebo 6 mg/kg) podávána zvířatům v průběhu podmiňování **metamfetaminem v dávce 5 mg/kg**. Vyjádřeno jako rozdíl procent času stráveného v původně nepreferované kleci po podmiňování a před podmiňováním. Vlastní efekt premedikace JMV2959 oproti kontrolní skupině je vyjádřen jako #  $P < 0,05$ , respektive ##  $P < 0,01$

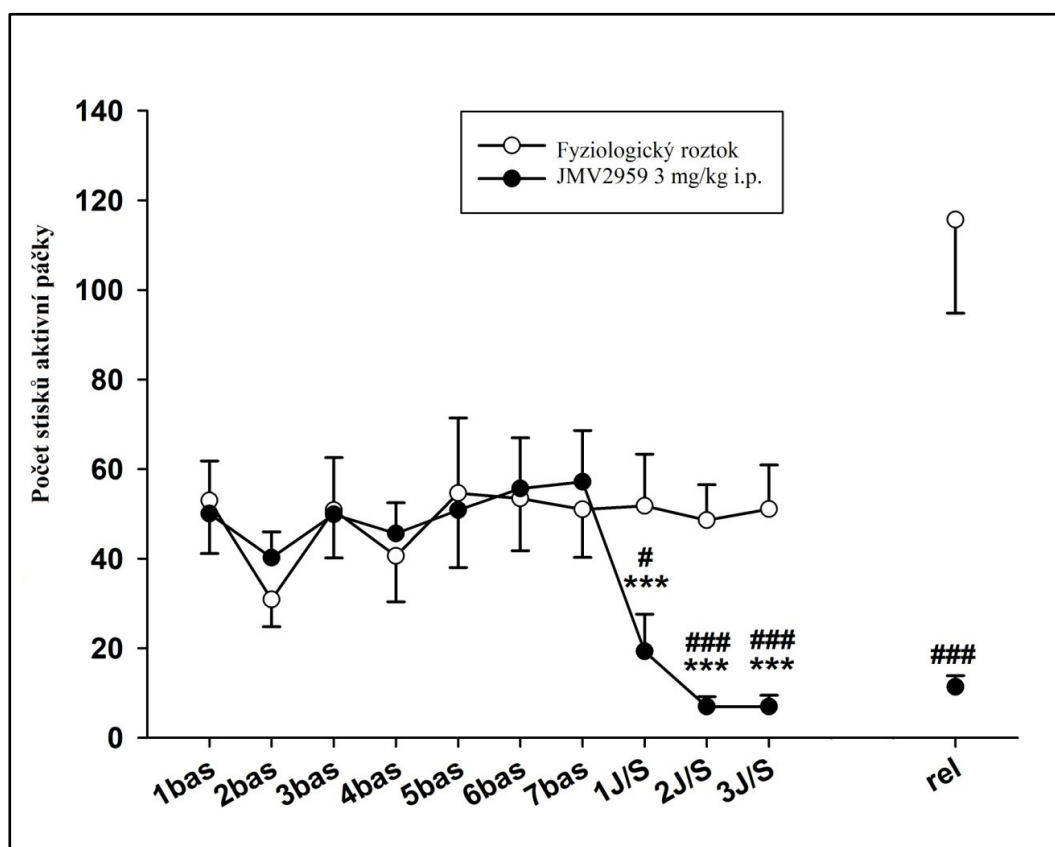
## 8.2. Intravenózní autoaplikace metamfetaminu (IVSA)

Výsledky studie IVSA jsou podrobně popsány v Havlíčková et al. 2018. V modelu intravenózní autoaplikace (self-administrace, IVSA) jsme sledovali vliv premedikace JMV2959 na spontánní příjem metamfetaminu. Porovnávali jsme příjem po premedikaci s tzv. bazálním ustáleným příjmem před premedikací a rozdíly mezi skupinami (JMV2959 skupina vs. kontrolní skupina). V průběhu zhruba 14 dnů před premedikací dosáhla zvířata v každodenních IVSA sezeních stabilního příjmu metamfetaminu. V grafech je znázorněn ustálený bazální příjem během posledních sedm dní před premedikací. Pro statistickou analýzu jsme užívali jako bazální hodnoty průměr hodnot z posledních tří sezení (dnů) ustáleného příjmu před premedikací.

### 8.2.1. Vliv ghrelinového antagonismu na spontánní příjem metamfetaminu

Po ustálení spontánního příjmu metamfetaminu následovaly tři po sobě jdoucí dny sezení, kdy byl skupině 12 zvířat vždy 20 minut před umístěním do self-administračního boxu

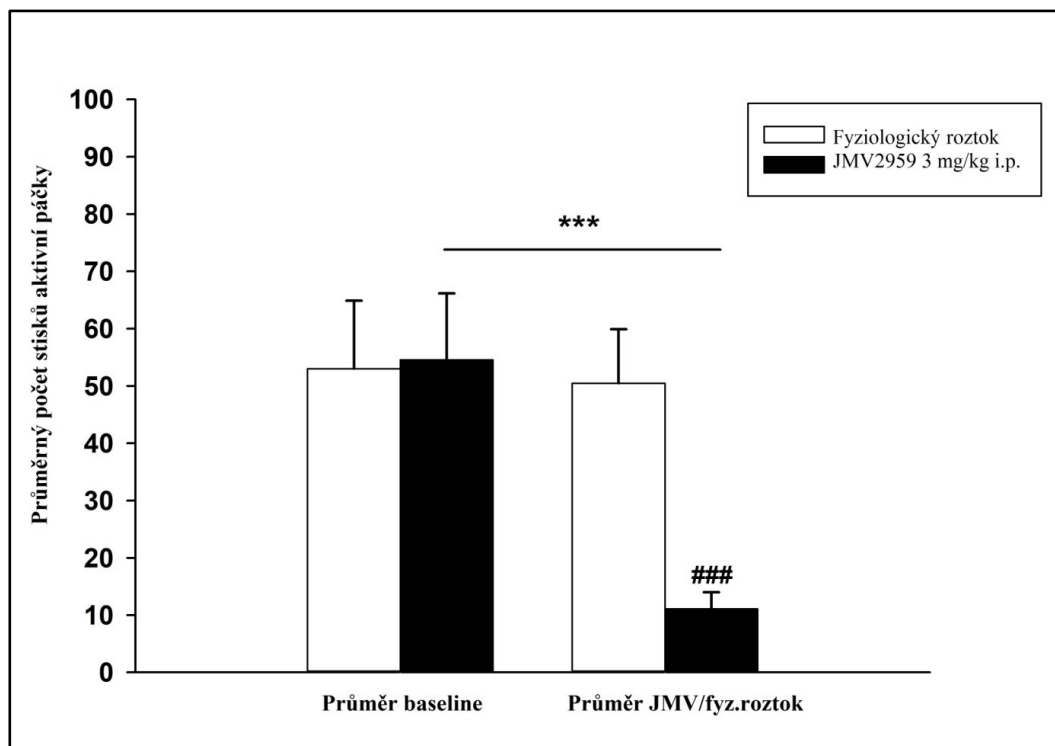
aplikován ghrelinový antagonist JMV2959 v dávce 3 mg/kg i.p. Kontrolní skupině (N = 8) byl adekvátně aplikován fyziologický roztok 0,1 ml/100g i.p. Dvoucestná analýza rozptylu pro opakovaná měření následovaná Bonferroniho testem prokázala statisticky významný pokles **počtu stlačení aktivní páčky** u zvířat, kterým byla před sezením aplikována látka JMV2959. U zvířat premedikovaných ghrelinovým antagonistou tedy spontánní příjem metamfetaminu významně poklesl, výraznější efekt jsme pozorovali druhý a třetí den premedikace (viz Obr. 20). Tedy došlo spíše k prohloubení účinku k efektům JMV2959, žádnou toleranci jsme nezaznamenali.



Obr. 20 Vliv premedikace JMV2959 (3mg/kg i.p. 20 minut před umístěním zvířete do self-administrační klece) na počet stlačení aktivní páčky při metamfetaminové IVSA. Rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako #  $P < 0,05$  resp. ###  $P < 0,001$ . Porovnání bazálního ustáleného příjmu metamfetaminu (5bas-7bas) a příjmu metamfetaminu po premedikaci (1J/S-3J/S) v rámci skupiny je vyjádřen jako \*\*\*  $P < 0,001$ . Tendence k relapsu (rel) testovaná 12. den po proběhlé nucené abstinenci byla premedikací JMV2959 také významně snížena oproti kontrole (###  $P < 0,001$ ).

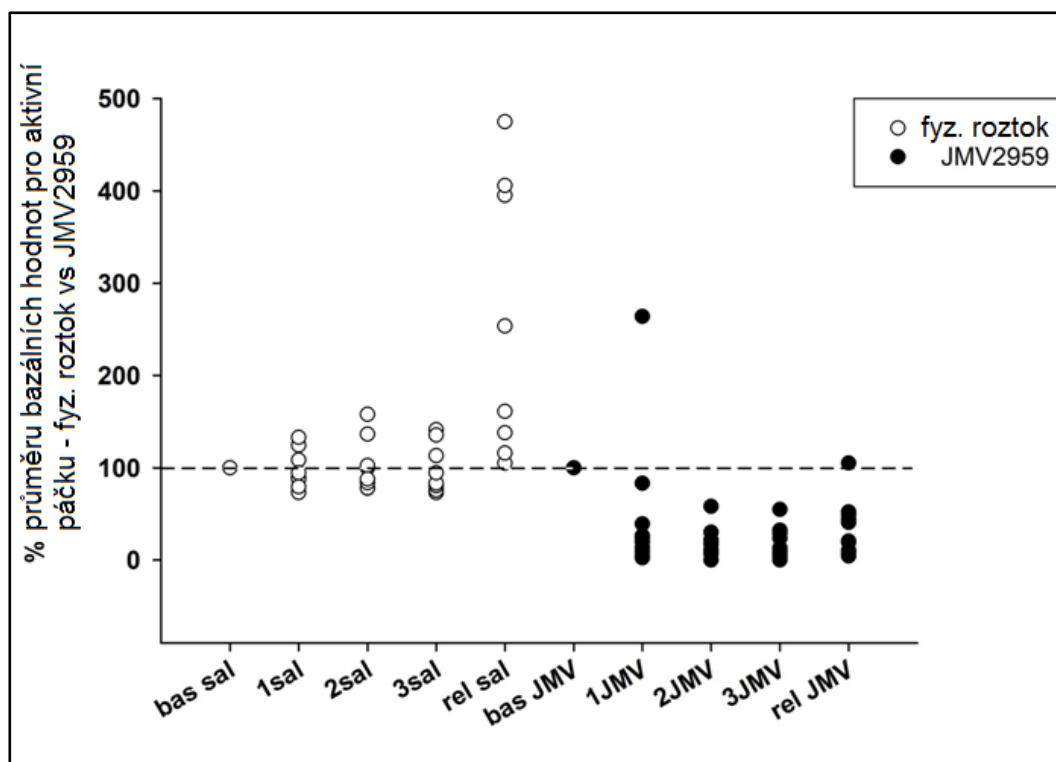
Pro výpočet průměrné hodnoty bazálního počtu stlačení aktivní páčky jsme použili data z posledních tří dní před premedikací (5bas-7bas). S touto hodnotou jsme pak dále počítali i v rámci statistického hodnocení jako s baseline. Hodnoty baseline kontrolní skupiny a skupiny premedikované ghrelinovým antagonistou se významně nelišily (viz. Obr. 20).

V případě počtu stlačení aktivní páčky to bylo  $53,0 \pm 11,9$  u kontrolní skupiny a  $54,5 \pm 11,6$  u skupiny následně premedikované JMV2959.



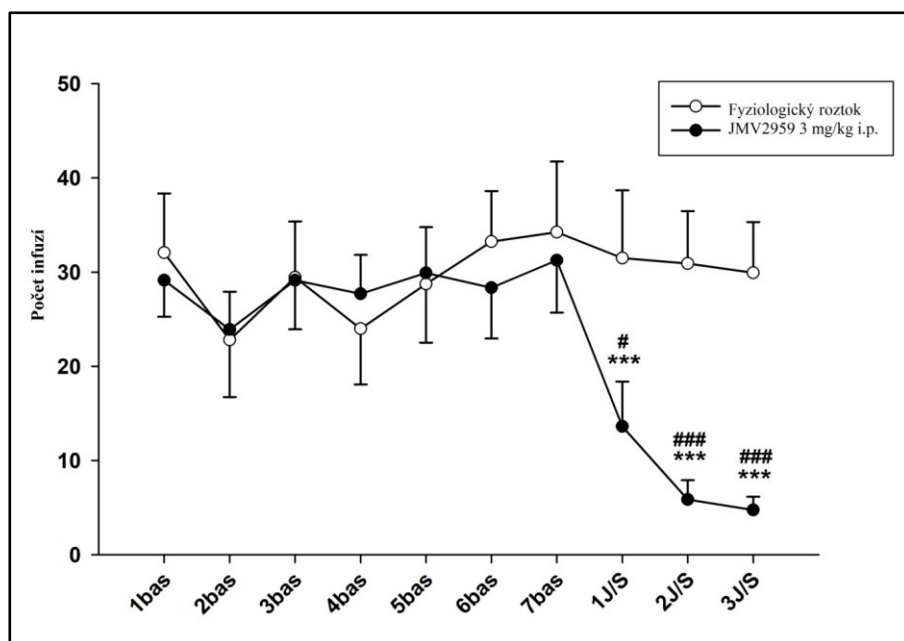
Obr. 21 Porovnání průměrného počtu stisků aktivní páčky v IVSA metamfetaminu před premedikací (baseline) a po premedikaci. Rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ , rozdíly v rámci skupiny před premedikací a po premedikaci jsou vyjádřeny jako \*\*\*  $P < 0,001$ .

Ačkoliv bylo možné pozorovat značné interindividuální rozdíly mezi jednotlivými zvířaty, v rámci skupiny šlo o významný pokles spontánního příjmu metamfetaminu oproti bazálním hodnotám i v porovnání průměrných hodnot obou skupin mezi sebou (viz Obr. 21). První premedikační den jsme po aplikaci JMV2959 u zvířat sledovali výrazné interindividuální rozdíly v reaktivitě (viz Obr. 22). Přesto u deseti z dvanácti zvířat došlo k poklesu počtu stlačení aktivní páčky pod 40% bazálních hodnot. U jednoho zvířete byly hodnoty přibližně shodné s bazálními a u jednoho zvířete došlo k navýšení počtu stlačení aktivní páčky na 264%. Tento jev si vysvětlujeme jako reakci na snížený pocit odměny oproti očekávání (vlivem premedikace JMV2959). Druhý a třetí den se hodnoty počtu stlačení aktivní páčky i u těchto dvou zvířat dále snížily a vyrovnaly se ostatním jedincům ve skupině. V kontrolní skupině počty stlačení aktivní páčky po premedikaci fyziologickým roztokem oscillovaly kolem bazálních hodnot.

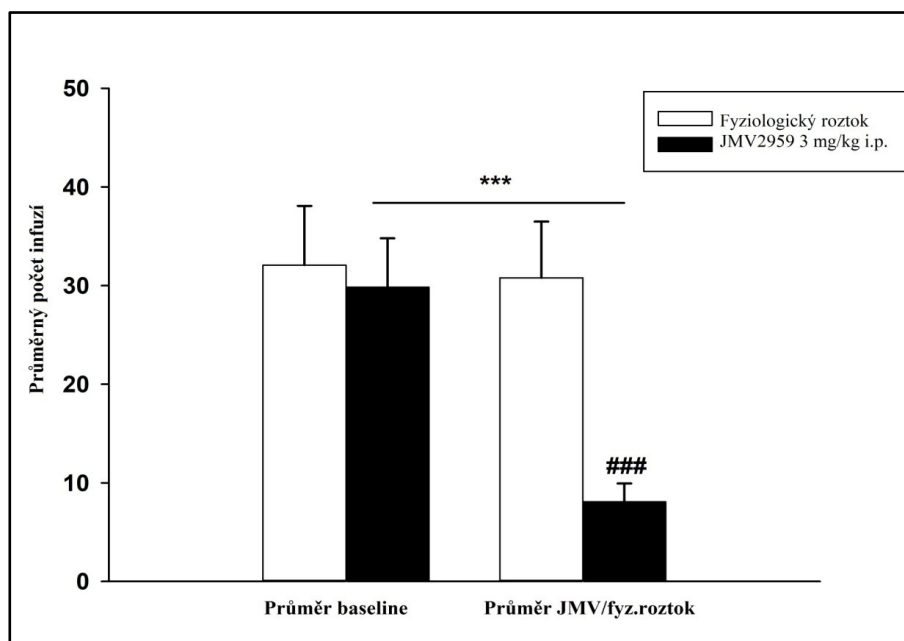


Obr. 22 Individuální rozdíly mezi jednotlivými zvířaty. Vliv premedikace JMV2959 vs fyz. roztoku na počet stlačení aktivní páčky vyjádřeno jako procenta průměru (z 3 posledních sezení předcházejících premedikaci) bazálních hodnot. JMV2959/fyz. roztok byl aplikován 20 minut před započítáním sezení. Jednotlivé hodnoty jsou vyznačeny v grafu následovně: fyz. roztok – prázdný kroužek; JMV2959 – plný kroužek, přerušovaná čára označuje hladinu průměru baseline (odpovídá 100% baseline). V průběhu sezení monitorujícího relapsové chování („rel“) nebyla zvířata připojena k infuzní pumpě.

Vedle počtu stlačení aktivní páčky jsme hodnotili i rozdíly v **počtu infuzí** (viz Obr. 23 a Obr. 24). Z důvodu prevence předávkování, následovala po každé infuzi 15s pauza, tzv. timeout, během které nebyla stlačení aktivní páčky odměňována infuzí. Reálný počet infuzí se tak liší od počtu stlačení aktivní páčky. Počet stlačení aktivní páčky vypovídá o snaze zvířete dostat se k droze, počet infuzí sleduje skutečný příjem metamfetaminu u jednotlivých zvířat. I v tomto případě byl bazální příjem metamfetaminu u obou skupin velmi podobný, u skupiny JMV2959 šlo průměrně o  $29,8 \pm 4,9$  infuzí, u kontrolní skupiny to bylo  $32,1 \pm 6,0$  infuzí. Stejně jako tomu bylo v případě počtu stlačení aktivní páčky, i zde ghrelinový antagonist JMV2959 významně snížil počet infuzí v průběhu sezení, tedy snížil spontánní příjem metamfetaminu (dvoucestná analýza rozptylu pro opakovaná měření následovaná Bonferroniho testem - two way ANOVA RM).



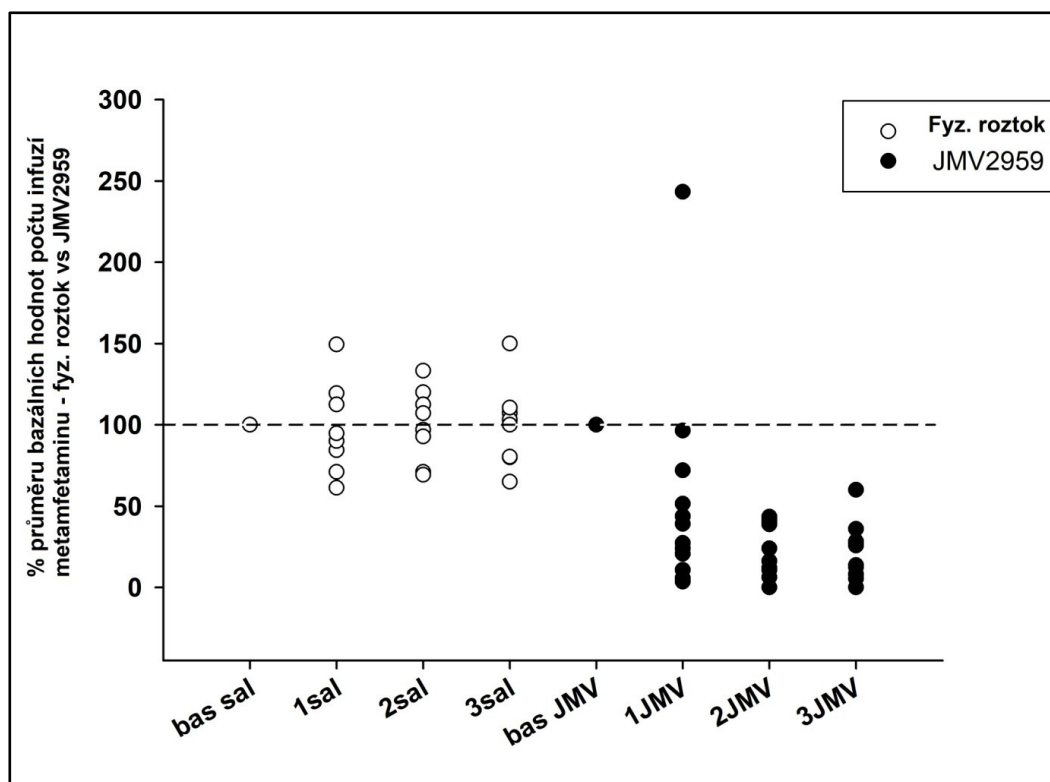
Obr. 23 Vliv premedikace JMV2959 (3mg/kg i.p., 20 minut před umístěním do self-administrační klece) na počet infuzí v průběhu metamfetaminové IVSA. Rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako #  $P < 0,05$  resp. ###  $P < 0,001$ . Porovnání bazálního ustáleného příjmu (5bas-7bas) metamfetaminu a příjmu metamfetaminu po premedikaci (JJ/S-3J/S) v rámci skupiny je vyjádřen jako \*\*\*  $P < 0,001$ .



Obr. 24 Porovnání průměrného počtu infuzí před premedikací (baseline) a po premedikaci. Rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ , rozdíly v rámci skupiny před premedikací a po premedikaci jsou vyjádřeny jako \*\*\*  $P < 0,001$ .

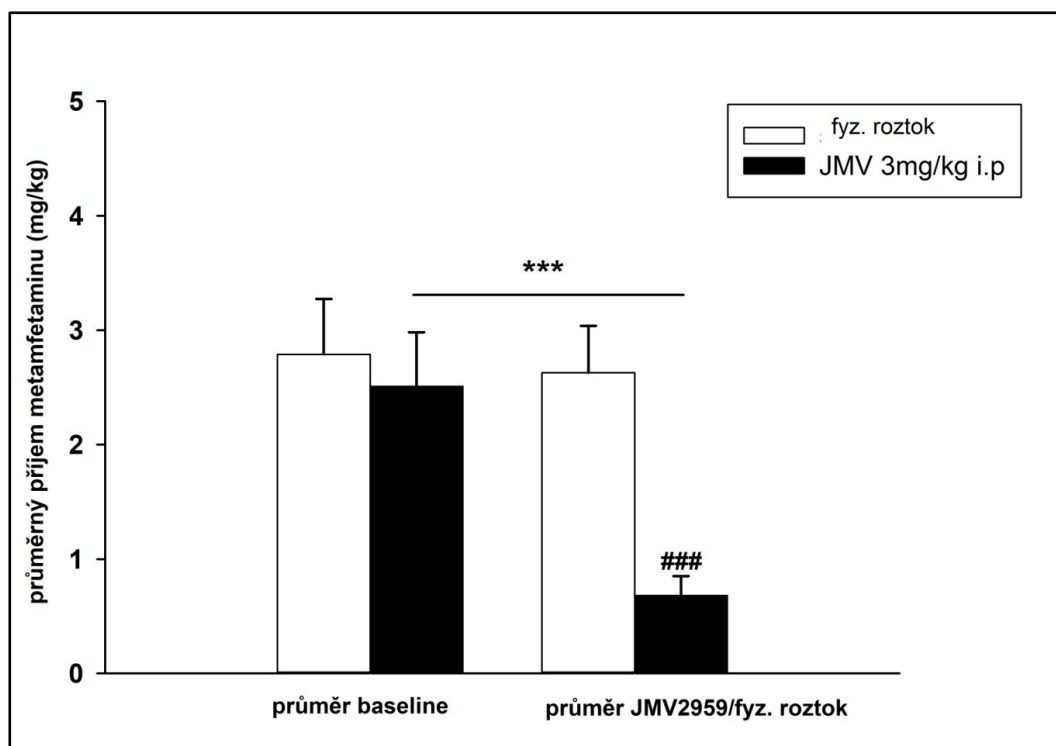
Stejně jako u počtu stlačení aktivní páčky jsme sledovali značné interindividuální rozdíly mezi jednotlivými zvířaty v rámci skupin i v případě počtu infuzí (viz Obr. 25).



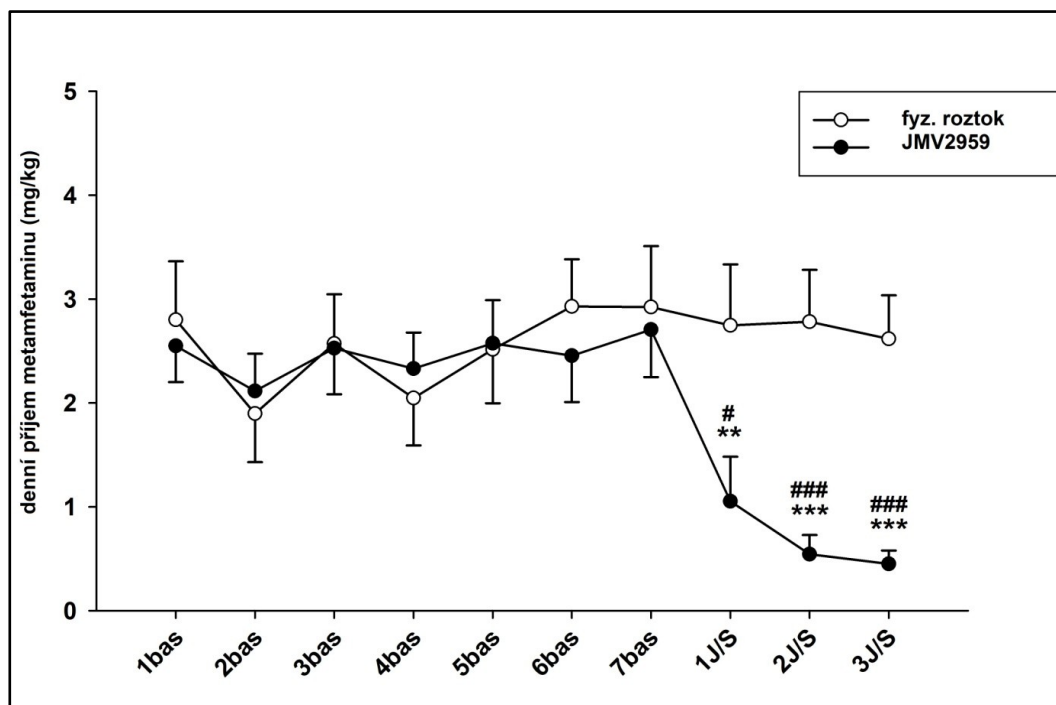


Obr. 25 Vliv premedikace JM2959/fyz. roztoku na počet infuzí metamfetaminu během IVSA u jednotlivých zvířat. Vyjádřeno jako procenta průměru bazálního příjmu. JM2959 v dávce 3 mg/kg i fyz. roztok byly aplikovány 20 minut před započítáním sezení i.p. Znárodnění skupin v grafu: fyz. roztok - prázdné kroužky, JM2959 – plné kroužky, přerušovaná čára vymezuje hladinu průměru baseline (100%).

Pro jasnější představu o přesném množství auto-aplikovaného metamfetaminu u jednotlivých zvířat jsme vypočetli denní dávky metamfetaminu u obou skupin zvířat v mg/kg (viz Obr. 26 a Obr. 27). Dávka metamfetaminu v jednotlivých infuzích byla 0,09 mg/kg/infuzi. Pro JM2959 premedikovanou skupinu šlo průměrně o denní dávku  $2,6 \pm 0,4$  mg/kg, kontrolní skupina měla průměrný denní bazální příjem metamfetaminu v dávce  $2,8 \pm 0,5$  mg/kg. V porovnání celkového příjmu metamfetaminu v jednotlivých skupinách v průběhu tří posledních dnů bazálního příjmu a tří premedikačních dnů dvoucestná analýza rozptylu (two-way ANOVA RM stejně jako two-way ANOVA) prokázala obdobné statisticky významné rozdíly mezi skupinou premedikovanou ghrelinovým antagonistou a kontrolní skupinou jako u počtu infuzí.

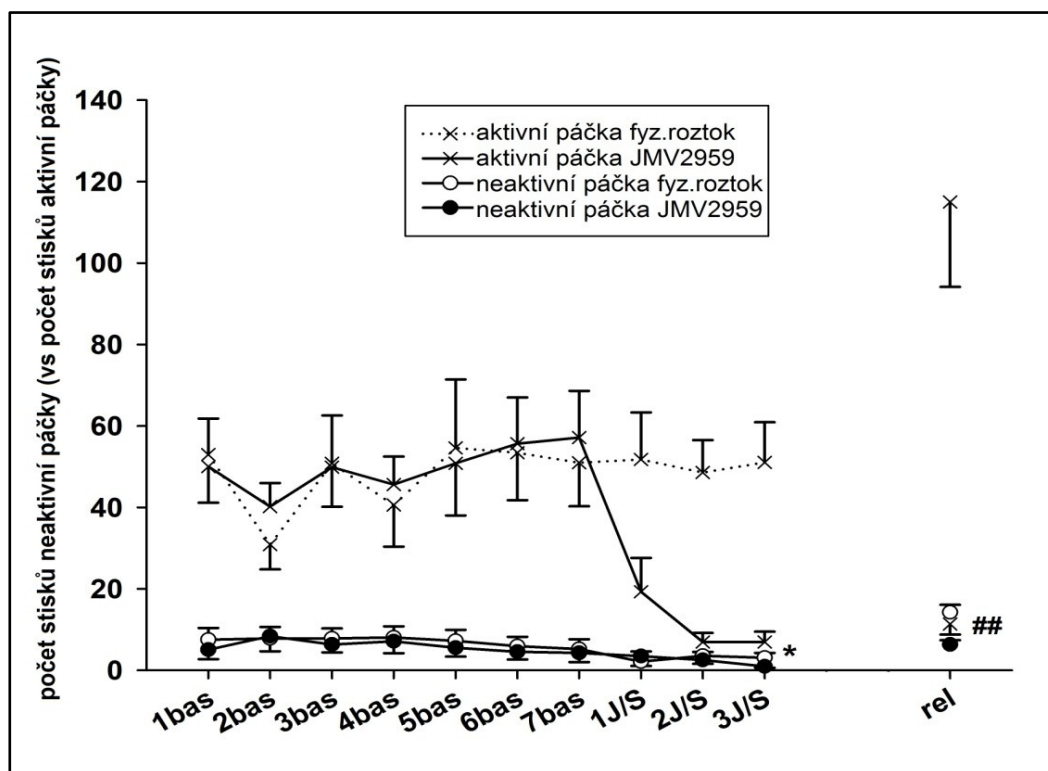


Obr. 26 Vliv premedikace JMV2959 na denní příjem metamfetaminu (v mg/kg) Rozdíly mezi skupinou premedikovanou ghrelinovým antagonistou a kontrolní skupinou jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ , porovnání příjmu metamfetaminu po premedikaci s původním bazálním příjmem v rámci jedné skupiny je vyjádřen jako \*\*\*  $P < 0,001$ .



Obr. 27 Vliv premedikace JMV2959 na průměrný denní příjem metamfetaminu (v mg/kg). Rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako #  $P < 0,05$  resp. ###  $P < 0,001$ . Porovnání bazálního ustáleného příjmu metamfetaminu a příjmu metamfetaminu po premedikaci v rámci skupiny je vyjádřen jako \*\*\*  $P < 0,001$ , resp. \*\*  $P < 0,01$ .

V počtu stlačení neaktivní páčky se skupiny statisticky významně nelišily (viz Obr. 28). Průměr bazálních počtů stlačení neaktivní páčky byl u skupiny JMV2959  $4,8 \pm 1,5$ , u kontrolní skupiny  $6,1 \pm 1,6$ , což je dáno inter-individuálními rozdíly mezi jednotlivými zvířaty v rámci skupiny. Dvoucestná analýza rozptylu pro opakovaná měření (two way ANOVA RM) neodhalila významné rozdíly mezi skupinami.

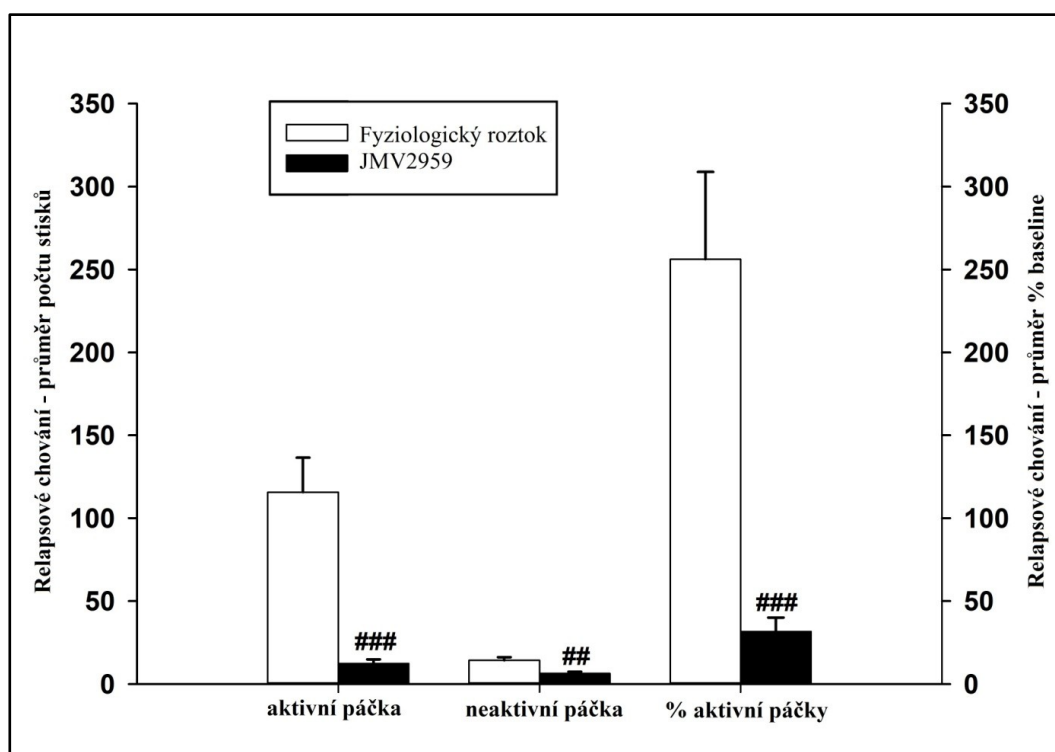


Obr. 28 Počty stlačení neaktivní páčky (v porovnání s počty stlačení aktivní páčky) v průběhu sezení v posledním týdnu před premedikací, třech premedikovaných sezeních a relapsovém sezení. Pro statistické zhodnocení dat byl vypočítán průměr z posledních tří dnů před premedikací (5.-7. bas), hodnoceno dvoucestnou analýzou rozptylu pro opakovaná měření (Two way ANOVA RM). Počet stlačení neaktivní páčky se mezi jednotlivými skupinami téměř nelišil.

#### 8.2.2. Vliv ghrelinového antagonistu v testu tendence k relapsu.

Po třech dnech, kdy zvířatům byl premedikován ghrelinový antagonist JMV2959 následovala jedenáctidenní nucená abstinence v domácích klecích. Zdravotní stav a kondice zvířat byly pravidelně sledovány. Po nucené abstinenci proběhlo 12. den poslední sezení, při kterém byla zvířata opět umístěna do self-administračních klecí, avšak již nebyla připojována k infuzním pumpám, tedy stlačení aktivní páčky nebylo odměněno infuzí metamfetaminu. 20 minut před tímto posledním sezením byl zvířatům aplikován ghrelinový antagonist (JMV2959, 3 mg/kg i.p.) nebo fyziologický roztok. Porovnávali jsme počet stlačení aktivní i

neaktivní páčky mezi skupinami i v rámci jedné skupiny vzhledem k bazálním hodnotám (viz Obr. 29.). Dále jsme počty stlačení přepočítali na procenta bazálních hodnot (viz Obr. 29. pravá osa v grafu). Kruskal-Vallis prokázala významné snížení hodnot po premedikaci JMV2959 (31,7 +/- 8,3% bazálních hodnot) ve srovnání s kontrolní skupinou jak v počtu stlačení aktivní páčky, tak i v procentech bazálních hodnot. Je zřejmé, že zvířata v kontrolní skupině po proběhlé abstinenci velmi intenzivně vyhledávala metamfetamin a stlačovala aktivní páčku mnohem častěji než během předcházejících IVSA sezení (256,2 +/- 52,6% bazálních hodnot). Jde o projev tzv. „inkubace bažení/cravingu“ po droze, resp. zvýšení citlivosti k droze nebo jejím připomínkám/navozeným vazbám v okolí (Hyman et al. 2006; Koob a Volkow 2016).



Obr. 29 Vliv premedikace JMV2959 na projevy tendence relapsu navozené metamfetaminem. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako ###  $P < 0,001$ , resp. ##  $P < 0,01$

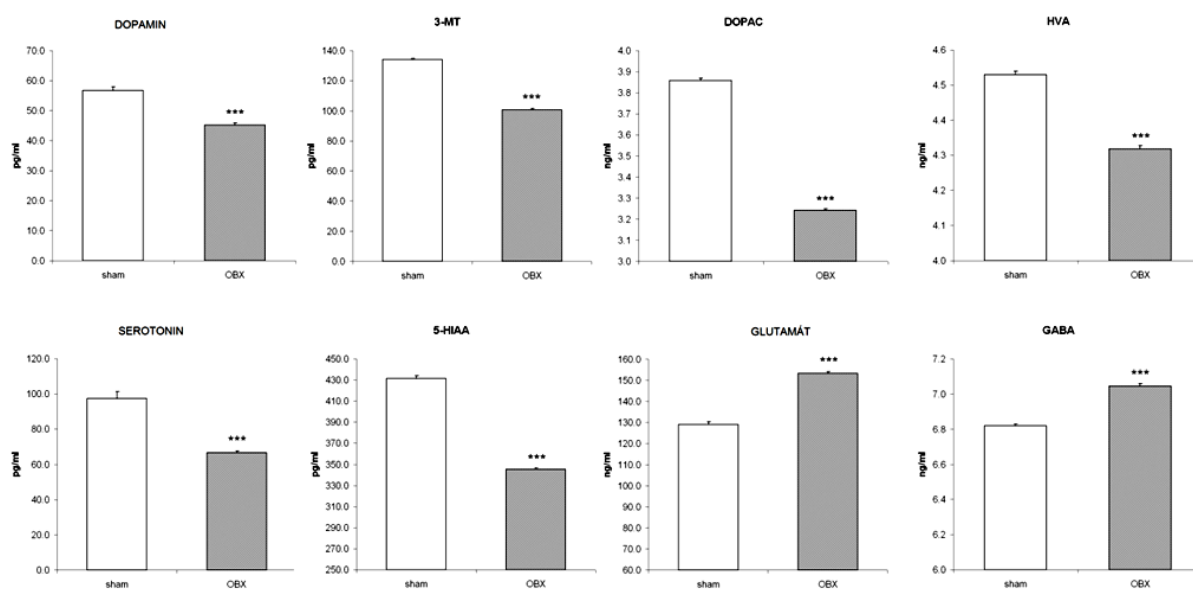
### 8.3. In vivo mikrodialýza u potkanů v modelu deprese

Výsledky studie jsou podrobně popsány v Rudá-Kučerová et al. 2015. V modelu deprese (bulbektomie čichových laloků) u potkanů jsme pomocí in vivo mikrodialýzy sledovali rozdíly extracelulárních koncentrací vybraných neuromediátorů v NAc shell mezi skupinou potkanů po bulbektomii (OBX) a skupinou falešně operovanou (sham). Dále jsme

sledovali rozdíly vlivu metamfetaminu na vyplavování vybraných neuromediátorů mezi skupinou OBX a sham. Monitorovali jsme i změny v chování u obou skupin zvířat.

### 8.3.1. Rozdíly v bazálních hladinách neurotransmiterů a jejich metabolitů v NAc shell u potkanů v modelu deprese

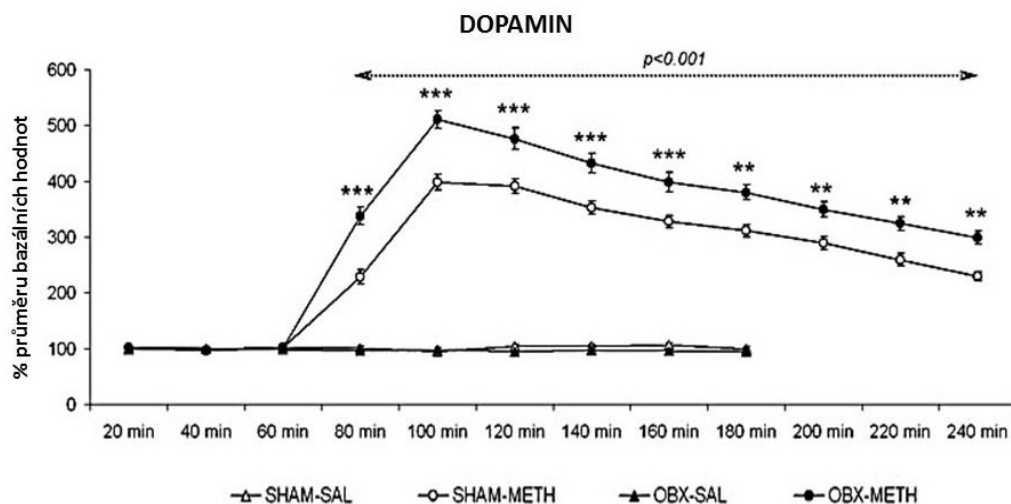
Bazální hodnoty neurotransmiterů i jejich metabolitů (viz Obr. 30) byly měřeny ve vzorcích odebraných v prvních třech intervalech in-vivo mikrodialýzy NAc shell. Hladiny dopaminu, serotoninu a jejich metabolitů byly významně nižší u OBX zvířat ( $P < 0,001$ ), naproti tomu hladiny glutamátu a GABA byly u OBX zvířat významně vyšší než u „sham“ skupiny ( $P < 0,001$ ).



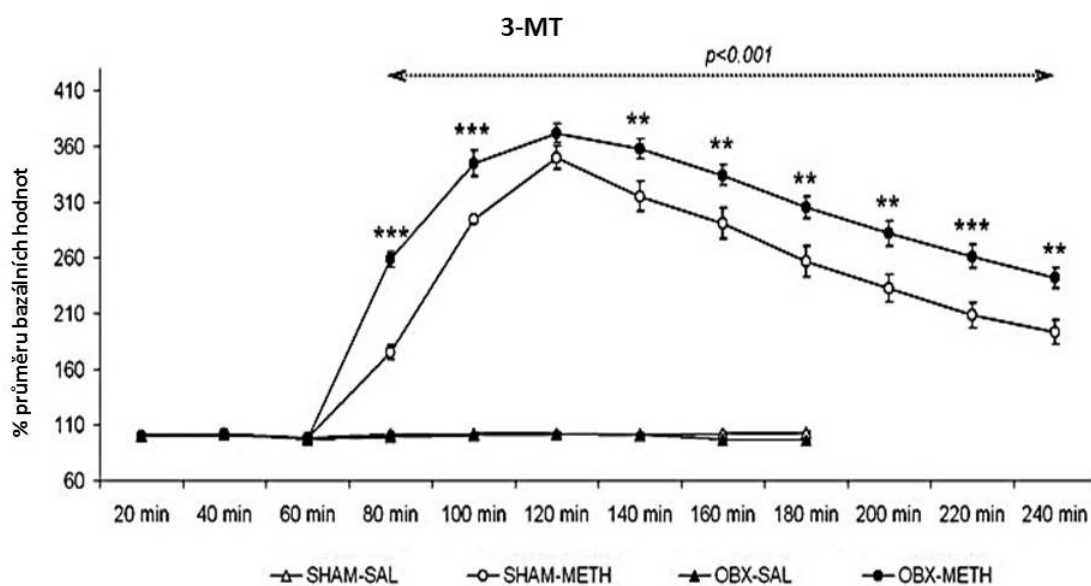
Obr. 30 Rozdíly v bazálních hladinách neurotransmiterů a jejich metabolitů u OBX zvířat (N=14) a „sham“ zvířat (N=12). Vyjádřeno jako průměr tří měřených „baseline“ intervalů. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami OBX a sham jsou vyjádřeny jako \*\*\* $P < 0,001$ . Uvádíme skupinové průměry  $\pm$  SEM.

### 8.3.2. Změny hladin neurotransmiterů a jejich metabolitů v NAc shell navozené aplikací metamfetaminu

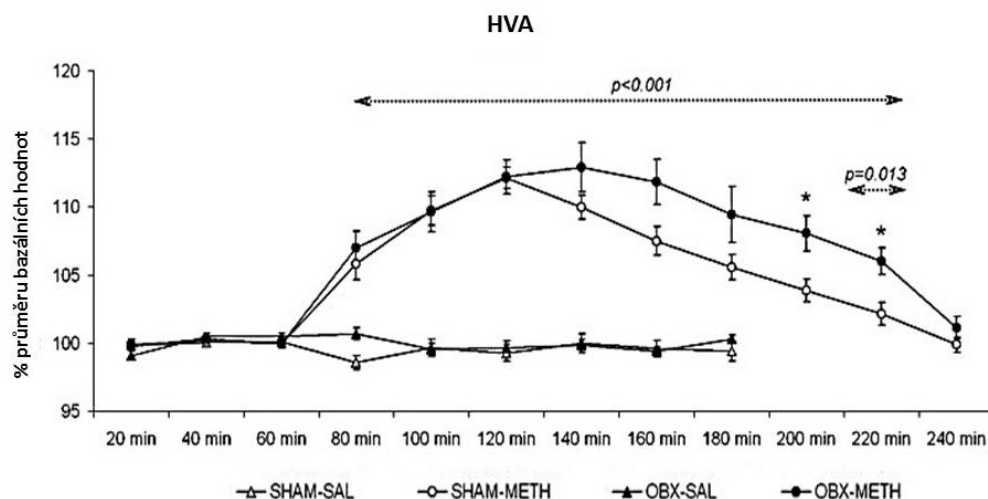
Změny v hladinách neurotransmiterů a jejich metabolitů v NAc shell po aplikaci metamfetaminu (5 mg/kg i.p.) jsou vyjádřeny jako procenta průměru bazálních hodnot /viz Obr. 31). Vzestup hladin dopaminu po aplikaci metamfetaminu byl u OBX zvířat významně vyšší a rychlejší než u kontrolní skupiny ( $P < 0,01$ ).



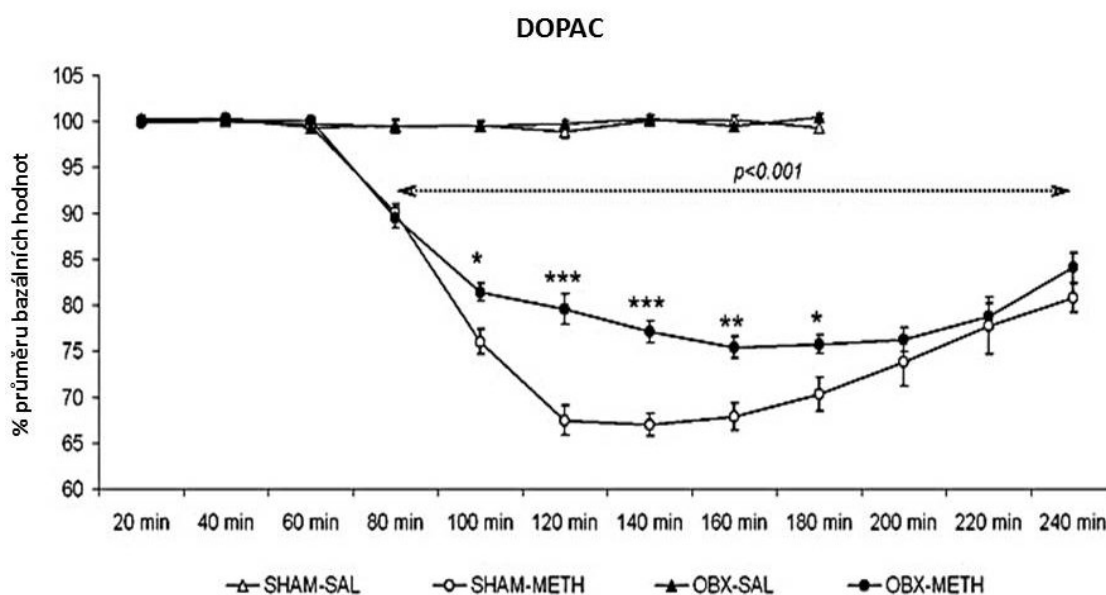
Obr. 31 Metamfetaminem navozené vyplavení dopaminu v NAc shell. Metamfetamin byl aplikován po 60 minutách od začátku experimentu. Grafické znázornění průměru ( $\pm$  SEM) relativních hodnot koncentrace dopaminu v NAc shell (vyjádřeno jako procento průměru bazálních hodnot) u všech skupin/premedikací. Horizontální linie ( $p < 0,001$ ) nad grafem znázorňuje významnost rozdílu u skupin (OBX + meth a SHAM + meth) po premedikaci metamfetaminem v porovnání s průměrem baseline. \* znázorňují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami, respektive skupinou OBX + meth a skupinou SHAM + meth v jednotlivých intervalech odběru vzorků. Při hladině významnosti \*\*\* pro  $P < 0,001$ , respektive \*\* pro  $P < 0,01$ ; statisticky vyjádřeno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu pro opakovaná měření (two way ANOVA RM) následované Bonferroniho t-testem.



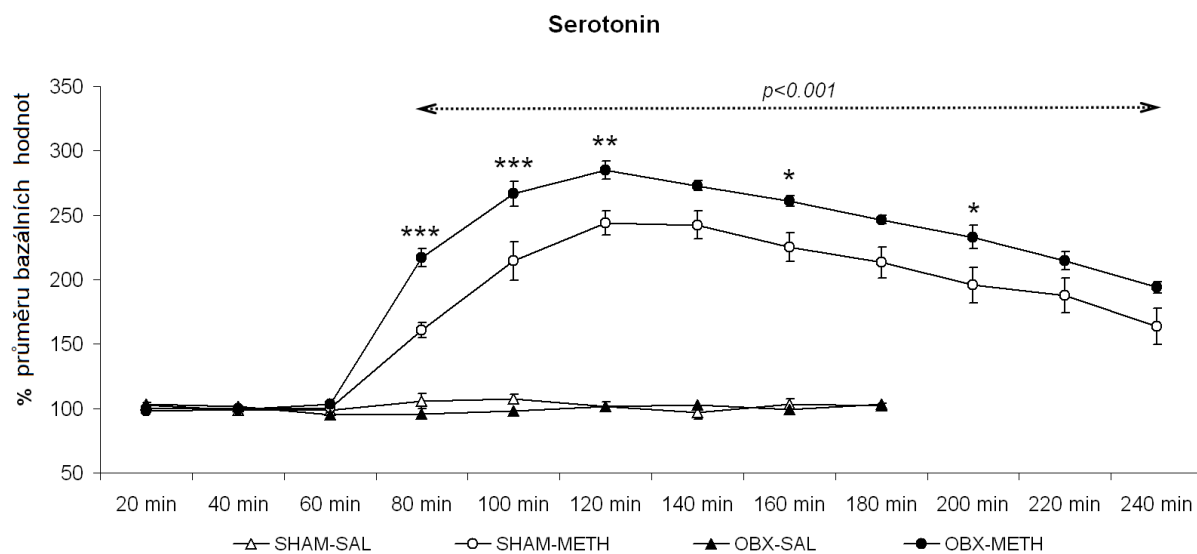
Obr. 32 Metamfetaminem navozené vyplavení metabolitu dopaminu 3-MT v NAc shell. Metamfetamin byl aplikován po 60 minutách od začátku experimentu. Grafické znázornění průměru ( $\pm$  SEM) relativních hodnot koncentrace metabolitů dopaminu v NAc shell (vyjádřeno jako procento průměru bazálních hodnot) u všech skupin/premedikací. Horizontální linie ( $p < 0,001$ ) nad grafem znázorňuje významnost rozdílu u skupin (OBX + meth a SHAM + meth) po premedikaci metamfetaminem v porovnání s průměrem baseline. \* znázorňují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami, respektive skupinou OBX + meth a skupinou SHAM + meth v jednotlivých intervalech odběru vzorků. Při hladině významnosti \*\*\* pro  $P < 0,001$ , respektive \*\* pro  $P < 0,01$ ; statisticky vyjádřeno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu pro opakovaná měření (two way ANOVA RM) následované Bonferroniho t-testem.



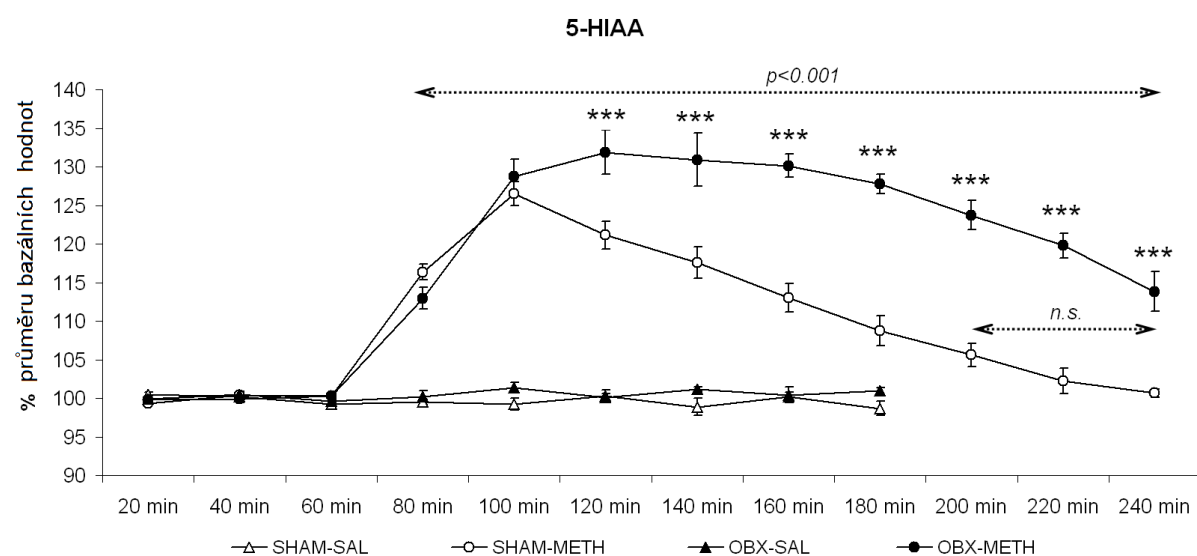
Obr. 33 Metamfetaminem navozené vyplavení metabolitu dopaminu HVA v NAc shell. Metamfetamin byl aplikován po 60 minutách od začátku experimentu. Grafické znázornění průměru ( $\pm$  SEM) relativních hodnot koncentrace metabolitů dopaminu v NAc shell (vyjádřeno jako procento průměru bazálních hodnot) u všech skupin/premedikací. Horizontální linie ( $p < 0,001$ ) nad grafem znázorňuje významnost rozdílu u skupin (OBX + meth a SHAM + meth) po premedikaci metamfetaminem v porovnání s průměrem baseline. \* znázorňují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami, respektive skupinou OBX + meth a skupinou SHAM + meth v jednotlivých intervalech odběru vzorků. Při hladině významnosti \* pro  $P < 0,05$ ; statisticky vyjádřeno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu pro opakovaná měření (two way ANOVA RM) následované Bonferroniho t-testem. Krátká horizontální linie značí nižší P hodnotu ( $P = 0,013$ ).



Obr. 34 Metamfetaminem navozené vyplavení metabolitu dopaminu DOPAC v NAc shell. Metamfetamin byl aplikován po 60 minutách od začátku experimentu. Grafické znázornění průměru ( $\pm$  SEM) relativních hodnot koncentrace metabolitů dopaminu v NAc shell (vyjádřeno jako procento průměru bazálních hodnot) u všech skupin/premedikací. Horizontální linie ( $p < 0,001$ ) nad grafem znázorňuje významnost rozdílu u skupin (OBX + meth a SHAM + meth) po premedikaci metamfetaminem v porovnání s průměrem baseline. \* znázorňují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami, respektive skupinou OBX + meth a skupinou SHAM + meth v jednotlivých intervalech odběru vzorků. Při hladině významnosti \*\*\* pro  $P < 0,001$ , respektive \*\* pro  $P < 0,01$ ; \*; pro  $P < 0,05$ ; statisticky vyjádřeno pomocí dvoucestné analýzy rozptylu pro opakovaná měření (two way ANOVA RM) následované Bonferroniho t-testem.



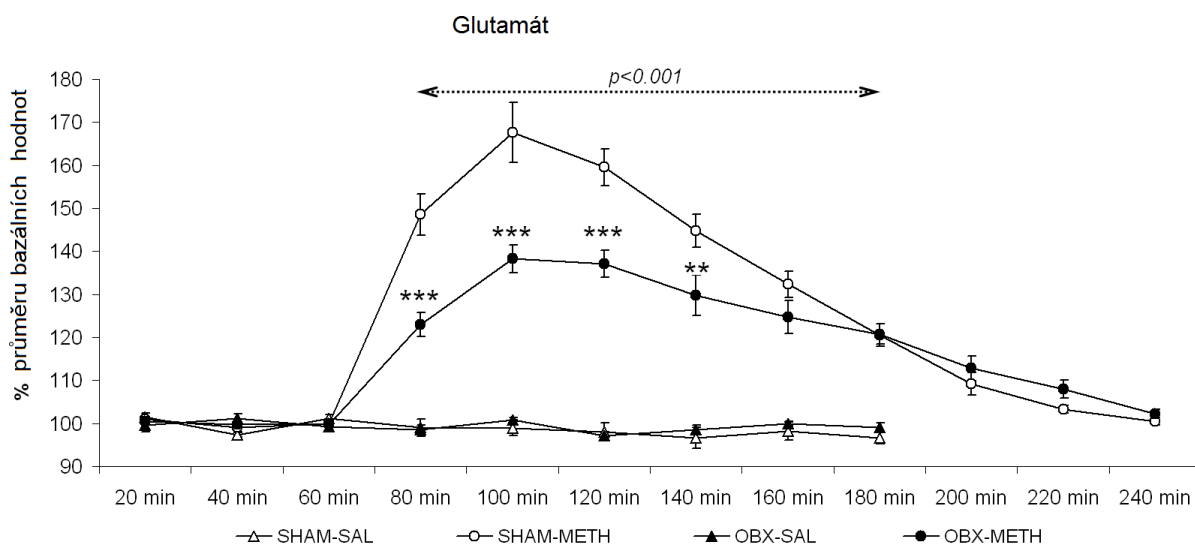
Obr. 35 Vývoj hladin serotoninu v NAc shell po aplikaci metamfetaminu (vyjádřeno jako % průměru bazálních hodnot). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami OBX a sham po aplikaci metamfetaminu byly vyjádřeny jako \*\*\* $P < 0,001$ , resp. \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ .



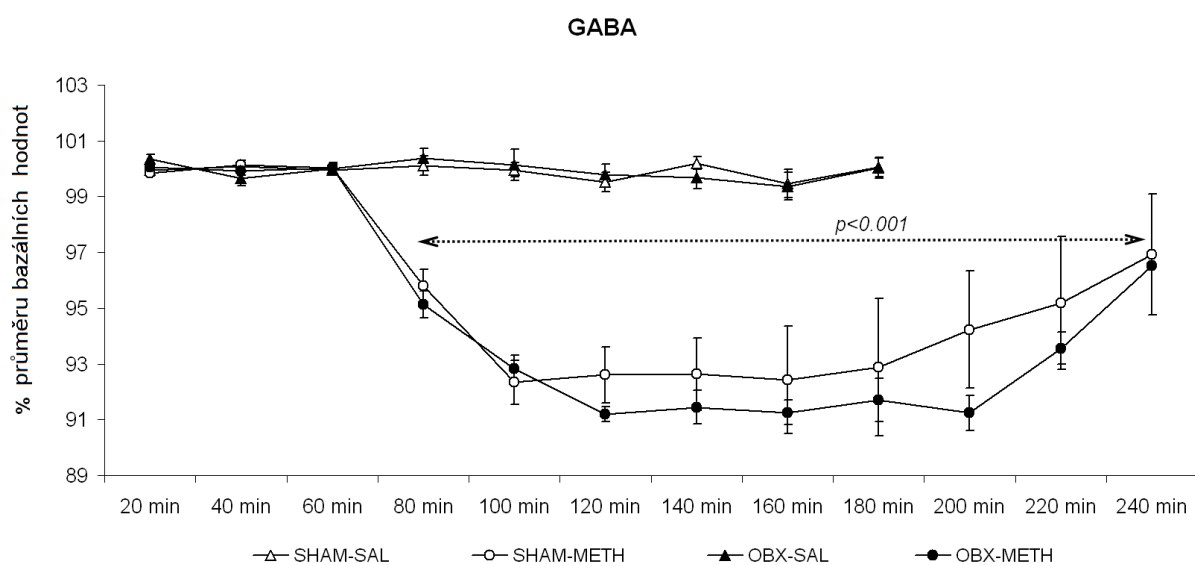
Obr. 36 Vývoj hladin metabolitu serotoninu 5-HIAA v NAc shell po aplikaci metamfetaminu (vyjádřeno jako % průměru bazálních hodnot). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami OBX a sham po aplikaci metamfetaminu byly vyjádřeny jako \*\*\* $P < 0,001$ .

Oproti tomu metamfetaminem vyvolaný vzestup glutamátu byl u OBX zvířat významně nižší než u kontrolní skupiny. Hladiny GABA v NAc shell byly vlivem aplikace metamfetaminu statisticky významně sniženy, avšak nebyl zde pozorován žádný rozdíl mezi OBX skupinou a kontrolní „sham“ skupinou.





Obr. 37 Vývoj hladin glutamátu v NAc shell po aplikaci metamfetaminu (vyjádřeno jako % průměru bazálních hodnot). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami OBX a sham po aplikaci metamfetaminu byly vyjádřeny jako \*\*\* $P < 0,001$ , resp. \*\* $P < 0,01$ .

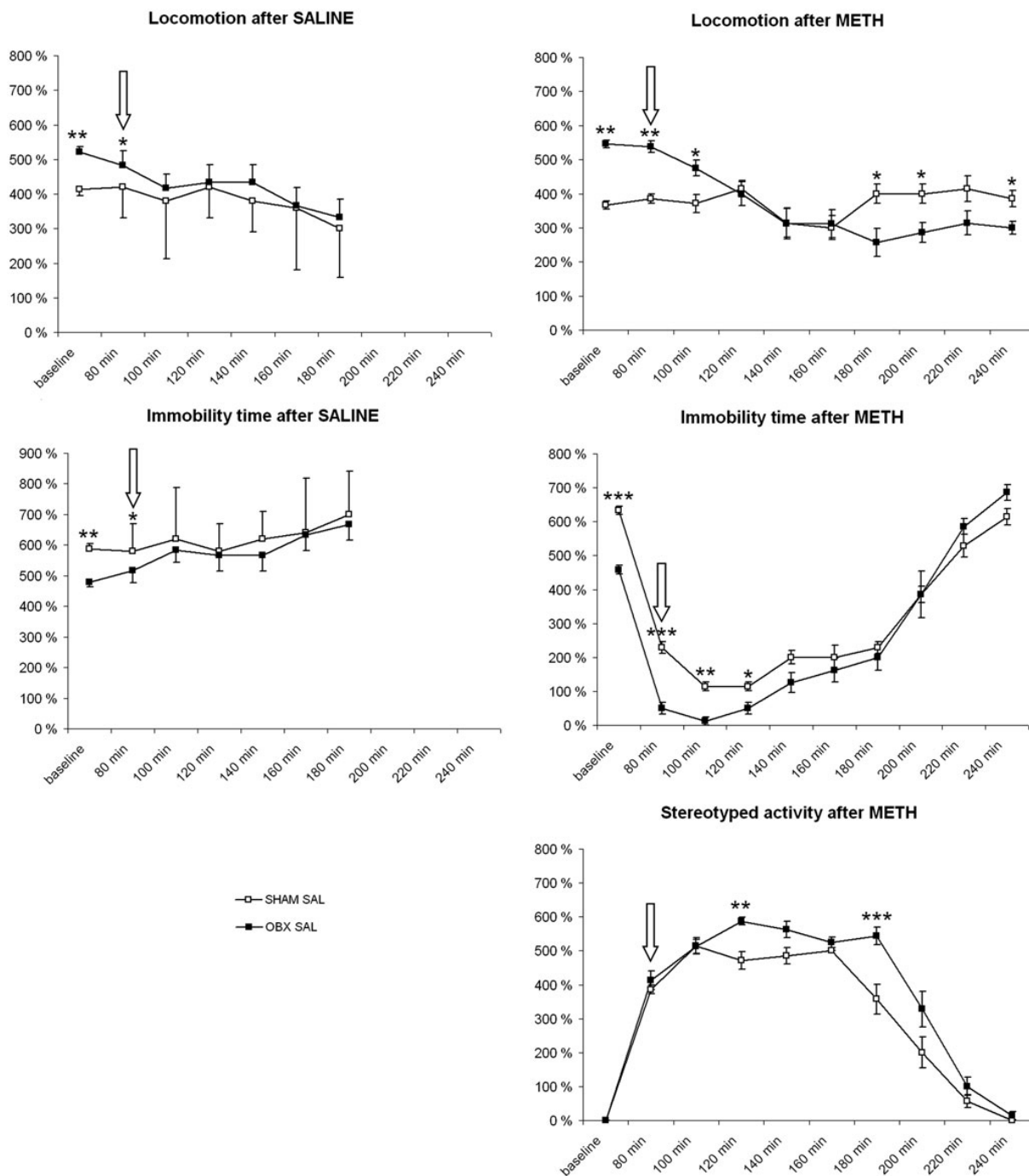


Obr. 38 Vývoj hladin GABA v NAc shell po aplikaci metamfetaminu (vyjádřeno jako % průměru bazálních hodnot)

### 8.3.3. Změny v chování zvířat v průběhu mikrodialýzy

V průběhu celého mikrodialyzačního sezení jsme zaznamenávali významné odlišnosti v chování obou skupin zvířat – OBX i kontrolní skupiny, a to jak v případě základního chování (před aplikací metamfetaminu), tak i v reakci na dávku metamfetaminu. OBX zvířata byla významně aktivnější a vykazovala zvýšenou lokomoci ještě před aplikací metamfetaminu oproti kontrolní skupině. Po aplikaci dávky metamfetaminu jsme u obou

skupin zvířat (OBX i sham) pozorovali podle očekávání stimulaci lokomoce, příslušné snížení imobility a výrazný výskyt prvků stereotypního chování (přežvykování, olizování, charakteristické pohyby/pokyvování hlavou, stereotypní čenichání apod.). U OBX skupiny zvířat byl výskyt stereotypií v chování mnohem významně vyšší než u kontrolní „sham“ skupiny. Nárůst lokomoční aktivity byl u OBX skupiny významně vyšší v počátku sezení a nižší v závěru sezení oproti kontrolní skupině, což značí větší efektivitu metamfetaminu v OBX skupině. Podle očekávání aplikace fyziologického roztoku nezpůsobila žádné změny v chování zvířat.



Obr. 39 Grafické znázornění rozdílů v zastoupení jednotlivých prvků chování mezi oběma skupinami, vyjádřeno jako procento času (z celkového času jednotlivých intervalů – 20 minut), které zvířata strávila daným prvkem chování. Jako baseline je brán průměr všech tří měření před aplikací metamfetaminu/fyz. roztoku (injekce vyznačena šipkami). Zvířata, kterým byl aplikován fyz. roztok, ukončila mikrodialyzační relaci dříve, což se odráží v záznamu chování. Hvězdičky označují významné rozdíly mezi skupinami SHAM a OBX (smíšený model ANOVA), \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ .

## 9. Diskuze

### 9.1. Vliv premedikace JMV2959 na IVSA metamfetaminu u potkanů

Z našich výsledků IVSA vyplývá, že ghrelinový antagonismus u potkanů významně snížil spontánní příjem metamfetaminu. IVSA představuje nejvalidnější experimentální model pro studium závislostních mechanismů a testování nových přístupů a směrů v terapii závislosti na návykových látkách, zejména těch aplikovaných intravenózně (Brady, 1991). Podobně jako přirozené odměny (energeticky bohatá potrava apod.) mohou látky vyvolávající závislost ovlivňovat chování laboratorních zvířat stejně jako u lidí (Brady, 1991). Potravní deprivace, stav způsobující zvýšení krevní hladiny ghrelu, navodil vyšší příjem amfetaminu a kokainu u potkanů v modelu IVSA (Carroll et al., 1979). V našem experimentu IVSA (Havlíčková et al. 2018) opakovaná aplikace GHS-R1A antagonisty (3 po sobě následující dny) významně snížila ustálený příjem metamfetaminu u potkanů. U 10 ze 12 zvířat aplikace JMV2959 (3 mg/kg) významně snížila příjem metamfetaminu již první premedikační den. To naznačuje, že tato zvířata akceptovala novou situaci, kdy se po stisku aktivní páčky nedostavila očekávaná odměna, a tak se chování usilující o odměnu významně snížilo. U jednoho potkana došlo naopak první den premedikace látkou JMV2959 k významnému navýšení počtu stisků aktivní páčky a k výraznému poklesu počtu stisků aktivní páčky až druhý a třetí premedikační den. Lze předpokládat, že takto zvíře reagovalo v prvním dni na významně snížené pocíťování odměny zvýšenou snahou o její získání. Dle dostupné literatury můžeme podobný jev pozorovat během prvního dne tzv. „extinction period“ (vyhasínání závislého chování), kdy je po předešlém ustáleném příjmu drogy zastavena dostupnost infuzí. I zde zpočátku počet stlačení aktivní páčky bývá významně vyšší v porovnání s bazálním počtem, zvířata usilovně mačkají páčku původně spojenou s infuzí, a až teprve v následujících dnech akceptují, že stlačení již nejsou odměňována aplikací návykové látky (metamfetamin – Pittenger et al., 2016; ketamin – van der Kam et al., 2009).

### 9.2. Vliv premedikace JMV2959 v testu tendence k relapsu po vynucené abstinenci (IVSA u potkanů)

Při testu vyhledávání metamfetaminu/tendence k relapsu po proběhlé vynucené abstinenci, byla zvířata umístěna zpět do selfadministračních klecí, ale bez připojení k infuzní pumpě. Zvířata v kontrolní skupině s premedikací fyziologického roztoku 20 min před sezením, vykazovala intenzivní vyhledávání metamfetaminu, tedy stlačování původně aktivní páčky, což potvrdilo inkubaci „cravingu“ v době abstinence (Hyman et al. 2006; Koob a

Volkow 2016). U pěti z osmi zvířat z kontrolní skupiny jsme pozorovali navýšení počtu stlačení aktivní páčky o více než 150% nad původní bazální hodnoty. Naproti tomu navýšení počtu stlačení neaktivní páčky nebylo nijak významné. Na rozdíl od kontrolní skupiny u zvířat premedikovaných antagonistou GHS-R1A – JMV2959 (3mg/kg) receptorů jsme zaznamenali v testu tendence k relapsu významný pokles počtu stlačení aktivní páčky na průměrných 31,7% původních bazálních hodnot. Počet stlačení neaktivní páčky se od bazálních hodnot významně nelišil. Lze tedy říci, že ghrelinový antagonismus významně snížil intenzivní vyhledávání metamfetaminu po období abstinence, které se u kontrolní skupiny výrazně projevilo. Podle našich zjištění byl ghrelinový antagonismus prozatím testován pomocí metody self-administrace pouze u alkoholové a sacharóзовé závislosti u myši nebo potkanů (Suchankova et al, 2013a; Gomez et al, 2015; Landgren et al., 2012) a nedávno také naší výzkumnou skupinou IVSA u opioidů/fentanylu (Sustkova-Fiserova a kol., 2019). Model IVSA u psychostimulantů dosud pro výzkum ghrelinového antagonismu využit nebyl.

### **9.3.Vliv premedikace JMV2959 na metamfetaminem podmíněnou preferenci místa**

Podobně jako IVSA patří drogou podmíněná preference místa (CPP) k zásadním animálním modelům pro studium závislosti na návykových látkách a testování nových přístupů v léčbě závislosti (Brady, 1991). V našem experimentu metamfetaminem podmíněné preference místa došlo k podmínění prostředí spojeného s aplikací vyšší (5 mg/kg) i nižší (2 mg/kg) dávky metamfetaminu. Nižší dávka metamfetaminu se navodila výraznější CPP a tedy větší pocíťování odměny (Havlíčková et al. 2018). To je v souladu s dostupnou literaturou, dle které dochází k podmíněné preferenci místa při dávkách metamfetaminu 0,125 – 5 mg/kg, kdy nejvýraznější efekt lze pozorovat při dávkách v rozmezí 0,5 – 2,5 mg/kg i.p. (Zakharova et al, 2009, Taslimi et al, 2018). Vyšší dávky metamfetaminu, počínající na 5 mg/kg, jsou často zneužívány lidskými uživateli návykových látek a nezřídka souvisí s rozvojem psychotických stavů (Glasner-Edwards et Mooney, 2014).

Premedikace JMV2959 statisticky významně a na dávce závisle zmírnila projev metamfetaminem podmíněné/navozené preference místa (CPP), a to u obou použitých dávek metamfetaminu (Havlíčková et al. 2018). V případě nižší dávky metamfetaminu (2 mg/kg) byl pozorovaný efekt premedikace výraznější, premedikace látkou JMV2959 v dávkách 1 a 3 mg/kg snížily projevy CPP s výraznou významností. Naproti tomu v případě vyšší dávky

metamfetaminu (5 mg/kg) došlo ke statisticky významnému poklesu především po podání JMV2959 v dávce 6 mg/kg, zatímco po premedikaci dávkami 1 a 3 mg/kg tento pokles projevů CPP nedosáhl hladiny významnosti. Premedikace ghrelinovým antagonistou (JMV 2959) tedy v CPP významně snížila projev metamfetaminem navozené touhy po droze („craving“) a očekávané odměně. V minulosti bylo prokázáno, že premedikace JMV2959 u myši snížila projevy nikotinem, kokainem a dex-amfetaminem navozené/podmíněné preference místa (Jerlhag et al, 2010; Jerlhag et al, 2011), což je v souladu s našimi výsledky. Aplikace JMV2959 (1 a 3 mg/kg) během podmiňování metamfetaminu s prostředím, významně snížila rozvoj CPP, což naznačuje, že ghrelinový antagonist významně snížil pocíťování odměny spojené s aplikací metamfetaminu (Havlíčková et al. 2018). Samotná aplikace JMV2959 podmíněnou preferenci místa nezpůsobuje (Jerlhag et al, 2009), stejně tak JMV2959 v dávce 3 mg/kg i.p. nevede u potkanů k averzi vůči prostředí, kde je aplikováno (Rodriguez et al, 2018). Již v minulosti jsme dokumentovali, že samotná aplikace JMV2959 v dávkách 1 a 3 mg/kg i.p. neovlivňuje významně hladiny dopaminu v NAc u potkanů, a že dávky 1, 3 a 6 mg/kg JMV2959 i.p. statisticky významně neovlivňují pohybovou aktivitu u potkanů (Sustkova-Fiserova et al, 2017; Jerabek et al, 2017).

**V našich IVSA a CPP studiích** jsme po premedikaci antagonistou GHS-R1A pozorovali významné snížení odměňovacích vlastností metamfetaminu. Přesné neurobiologické mechanismy účastníci se těchto procesu je třeba dále studovat a specifikovat. Na základě současných poznatků předpokládáme, že antagonistou GHS-R1A navozené snížení vyplavování dopaminu po aplikaci derivátů amfetaminu v NAc hraje v těchto mechanismech zásadní roli (Jerlhag et al., 2010), zejména vzhledem k faktu, že dopamin v NAc shell se významně podílí na odměňovacích účincích i posilování asociací spojených s užitím/efektem návykových látek, včetně amfetaminu a jeho derivátů (Di Chiara, 1999; Hyman et al. 2006; Koob a Volkow 2016). Je samozřejmě třeba brát v úvahu komplexnější účast dalších neuromediátorových systémů, které se odměňovacích/posilovacích mechanismů účastní. Byla popsána účast endokanabinoidního systému v akumbálních (met)amfetaminových posilovacích/odměňovacích procesech. CB1 antagonist ovlivňuje IVSA metamfetaminu, stejně jako intra-akumbální self-administraci metamfetaminu a snižuje amfetaminem způsobené vyplavení dopaminu v NAc (Vinklerova et al., 2002; Rodriguez et al., 2011; Kleijn et al., 2012; Thiemann et al., 2008; Su et Zhao, 2017). Současně byly popsány interakce mezi ghrelinovým, endokanabinoidním a dopaminergním systémem v NAc (Sustkova-Fiserova et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2016). Bylo zjištěno, že premedikace

antagonistou CB1 snížila ghrelinem navozené vyplavení mezolimbického dopaminu u myši (Kalafateli et al, 2018). Také GABAergní systém hraje prostřednictvím různých drah důležitou roli ve zneužívání stimulantů amfetaminového typu (Jiao et al., 2015). Byly nalezeny také další interakce mezi ghrelinovým, endokanabinoidním, GABAergním, opioidním a dopaminergním systémem v NAc a VTA, které mohou hrát roli v odměňovacích a posilovacích vlastnostech návykových látek (Sustkova-Fiserova et al. 2017). Právě premedikace látkou JMV2959 u potkanů významně snížila/zvrátila efekt opioidů zvyšující hladiny N-arachidonoylethanolaminu (anandamid, AEA) v NAc, také snížila opioidy indukované vyplavení GABA. Oba tyto systémy jsou považovány za součást odměňovacích mechanismů opioidů (Sustkova-Fiserova et al., 2017). Je zde tedy několik neurálních systémů zahrnujících několik možných mozkových struktur, které se účastní pozorovaného efektu ghrelinového antagonisty JMV2959 v procesování odměny a posilovacích účinků. Lze předpokládat, že i u metamfetaminu může ghrelinový antagonismus zasahovat do posilovacích mechanismů modulací dopaminergních, případně i na dopaminu nezávislých mechanismů, další výzkum je nezbytný.

Metabotropní GHS-R1A vykazuje výraznou vnitřní na ligandu nezávislou aktivitu, což mimo jiné poukazuje na možné výhody užití inverzního agonisty tohoto receptoru v klinické praxi (M'Kadmi et al, 2015, Moulin et al, 2007; Holst et al., 2003). Látka JMV2959, která je široce rozšířeným experimentálně využívaným antagonistou GHS-R1A, se zatím do klinického výzkumu nedostala. Doposud se z řady známých látek s antagonistickým efektem vůči ghrelinu do klinického testování dostal pouze jeden inverzní agonista, látka PF-5190457, který splnil přísné požadavky pro zařazení do klinické studie s alkoholiky (Costantino et Barlocco, 2014; Lee et al., 2018). Potenciální efektivitu ghrelinového antagonismu v ovlivnění posilovacích mechanismů metamfetaminové, kterou jsme potvrdili v našich studiích s JMV2959, lze považovat za nadějný nový mechanismus/přístup, který lze eventuálně využít i u ostatních klinicky akceptovatelných látek s antagonistickým účinkem na GHS-R1A.

Samotný ghrelin (acylovaný) vykazuje poměrně komplexní spektrum účinků na systémový metabolismus. Stimuluje motilitu střev a sekreci žaludeční kyseliny, reguluje metabolismus glukózy, inhibuje sekreci inzulínu, zvyšuje adipozitu apod. Vedle vlivu na chování vedoucí k vyhledávání odměny ovlivňuje ghrelin spánek, stres, úzkost, učení a paměť. Dále byl popsán i ochranný vliv před svalovou atrofií, zlepšení některých

kardiovaskulárních funkcí a také vliv na retinopatii (Müller et al., 2015). Studie zabývající se různými GHS-R1A antagonisty nebo inverzními agonisty dokládají účast složitějších mechanismů a naznačují předpokládané zapojení různých receptorových podtypů či účast různých typů G-proteinů (M'Kadmi et al., 2015). V naší studii byla látka JMV2959 aplikována zvířatům v jedné, třech nebo osmi denních dávkách vždy společně s aplikací metamfetaminu či následována aplikacemi metamfetaminu, což znemožnilo sledování antropometrických a metabolických změn navozených pouze aplikací JMV2959. V naší IVSA studii jsme nepozorovali žádný vliv tří denních dávek na tělesnou hmotnost u potkanů. V průběhu self-administrace metamfetaminu nedocházelo v souladu s našimi očekáváními k navýšení hmotnosti u potkanů, pouze 12. den nucené abstinence jsme zaznamenali významné zvýšení tělesné hmotnosti u obou skupin zvířat v průměru o 62 g u skupiny premedikované JMV295 a o 63 g v kontrolní skupině zvířat. Ačkoliv bylo již dříve popsáno, že JMV2959 nebo další antagonisté GHS-R1A receptorů zrušily některé účinky současně podávaného ghrelinu, jakými jsou například zvýšení tělesné hmotnosti, příjmu potravy a tukové hmoty, potlačení glukózou indukované inzulinové sekrece nebo zvýšení akumbálních hladin dopaminu a další, samotné podání JMV2959 ve stejných dávkách bez současné aplikace ghrelinu nemělo na tyto procesy žádný významný vliv (Jerlhag et al, 2010; Jerabek et al., 2017; Esler et al., 2007; Moulin et al., 2013; Sustkova-Fiserova et al. 2017; Sustkova-Fiserova et al. 2014; Sustkova-Fiserova et al. 2016; Sustkova-Fiserova et al. 2019). Navíc, chronicky podávaný JMV2959 úplně neodstranil chronickým ghrelinem zvýšený příjem potravy u potkanů, a také vliv ghrelinu na gnovou expresi v hypotalamu apod (Moulin et al., 2013). Účast dalších receptorových subtypů, možný vliv des-acyl ghrelinu, existence receptorových spoluprací (vytváření oligomerů, heterodimerů atp.) atd. naznačuje vysvětlení pozorovaných rozdílů v účincích GHS-R1A ligandů (M/Kadmi et al. 2015; Moulin et al. 2013). Je nezbytný další výzkum a vývoj nových ligandů, které selektivně zacílí na jednotlivé signální dráhy spojené s GHS-R1A receptory, a které by mohly léčit konkrétní poruchy (závislost, obezita apod.) s minimálními vedlejšími účinky (M'Kadmi et al., 2015).

#### **9.4. In vivo mikrodialýza nucleus accumbens u potkanů v modelu deprese, změny hladin neurotransmiterů navozené aplikací metamfetaminu**

Vzhledem k tomu, že jeden z hlavních symptomů deprese je neschopnost prožívat radost a z něčeho se těšit, předpokládá se, že dochází k poruchám regulace mezolimbického dopaminergního systému odměny, což může přispívat k vyššímu riziku komorbidního současného užívání návykových látek (Nestler and Carlezon, 2006). Z klinické praxe je



známo, že mírné zlepšení dopaminergních funkcí je alespoň částečně zodpovědné za antidepressivní efekt některých léčiv, například bupropionu (Quesseveur et al, 2013). Tento předpoklad podporují i některé preklinické studie, kdy u geneticky modifikovaných myší (disrupted-in-schizophrenia-1 protein, DISC1-Q31L mutant) vykazujících depresivní znaky v chování, byly sníženy hladiny dopaminu, noradrenalinu a serotoninu v NAc (Lipina et al., 2013). To je v souladu s výsledky naší studie. I když se mohou hladiny neurotransmiterů v různých mozkových oblastech/strukturách lišit (Masini et al, 2004), zdá se, že většinou nižší koncentrace monoaminů v NAc jsou spojené s fenotypem depresivního typu.

Naše výsledky (Rudá-Kučerová et al. 2015) dokumentují, že bazální hladiny dopaminu, serotoninu a jejich vybraných metabolitů v NAc byly u OBX zvířat významně nižší než u kontrolní skupiny. Oproti tomu hladiny glutamátu a GABA byly v porovnání s kontrolní skupinou významně zvýšené. Dále jsme pozorovali významné zvýšení výsledného produktu metabolismu dopaminu (HVA) a tendenci ke snížení produkce 3-MT a zvýšení produkce DOPAC, což naznačuje poněkud vyšší aktivitu MAO v metabolismu dopaminu u OBX zvířat.

Hypotéza self-medikace/terapie užíváním drog u depresivních osob, byla opakovaně podpořena v dříve provedených studiích intravenózní self-administrace (IVSA) u potkanů, kdy v modelu deprese - u OBX zvířat docházelo k vyššímu spontánnímu příjmu amfetaminu (Holmes et al., 2002) i metamfetaminu (Kucerova et al., 2012). V naší studii jsme prokázali, že aplikace metamfetaminu (5 mg/kg) vedla u OBX zvířat ke zvýšenému uvolňování dopaminu a zvýšenému metabolismu dopaminu v NAc v porovnání s kontrolní „sham“ skupinou (Rudá-Kučerová et al. 2015).

Jedním ze známých znaků depresivní poruchy je snížené množství serotoninu v mozku. Snížená serotoninergní signalizace po operaci u OBX zvířat v našem experimentu podpořila platnost tohoto modelu deprese. Snížená produkce serotoninu v mozku po OBX operaci je kompenzována zvýšenou 5-HT inervací v prefrontální kůře a zvýšením počtu serotoninových transportérů (Song and Leonard, 2005). Mnohé studie ukazují, že amfetaminy indukují masivní uvolnění serotoninu v různých oblastech mozku (Matsumoto et al., 2014). Podle očekávání jsme tento efekt pozorovali po aplikaci dávky metamfetaminu u OBX i u „sham“ potkanů. Podobně jako v případě dopaminu, u OBX skupiny potkanů jsme v NAc pozorovali výraznější efekt metamfetaminu, tedy vyšší nárůst serotoninu (5-HT) i jeho metabolitu (5-HIAA).

Bylo již dostatečně potvrzeno, že obsah monoaminů (včetně dopaminu a serotoninu) v mikrodialyzátech reflektuje jejich přítomnost v extracelulárním kompartmentu, a je tvořen vylitím neurotransmiterů z nervových zakončení do synapse. Předcházející testy našeho uspořádání in vivo mikrodialýzy prokázaly, že také uvolňování GABA v našich experimentech je závislé na přítomnosti vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) v dialyzačním roztoku (upravený Ringerův roztok), a pochází tedy z neuronálních synapsí. V případě glutamátu lze zvažovat uvolňování z gliových buněk (Šustková-Fišerová et al. 2017; Rudá-Kučerová et al. 2015). Excitační a inhibiční systémy zahrnující glutamát a GABA jsou u OBX zvířat v nerovnováze (Song and Leonard, 2005). GABA-ergní systém v OBX modelu deprese je většinou popisovaný jako hyperaktivní, což je v souladu s našimi bazálními daty, tedy zvýšení bazálních hladin GABA v NAC u OBX potkanů (Song a Leonard, 2005; Rudá-Kučerová et al. 2015). Také bazální hladiny glutamátu byly v naší OBX skupině potkanů zvýšené, což koresponduje s některými s řady různorodých literárních dat, jež popisují hyperaktivní reaktivitu (Ho et al. 2000) i hypoaktivitu (Song a Leonard, 2005) glutamatergního systému v různých částech mozku bulbektomovaných zvířat. Je známo, že GABA-ergní i glutamatergní (Tzschentke 2002) se významně modulačně podílejí zejména na posilovacích neuronálních procesech v rámci opakovaného příjmu drog (včetně metamfetaminu) např. při rozvoji senzitivace (Koob a Volkow 2016). V NAC lze pozorovat vzájemně modulační mechanismy a vztahy mezi dopaminem, glutamátem, GABA (Schoffelmeer et al. 2000). Pozorované účinky akutní dávky metamfetaminu na glutamát (menší zvýšení koncentrace v OBX skupině oproti kontrole) a GABA (snížení koncentrace obdobně v OBX i „sham“ skupině) v NAC jsou pravděpodobně vzájemně závislé.

Během in vivo mikrodialýzy jsme ve stejných/odběrových intervalech hodnotili také probíhající změny v chování zvířat. Ve shodě s literaturou (Song a Leonard 2005) jsme pozorovali významně zvýšenou behaviorální aktivitu (lokomoce) u OBX zvířat ve srovnání s kontrolní „sham“ skupinou. Také metamfетamin navodil u potkanů po OBX významně vyšší behaviorální stimulaci a více stereotypních prvků v chování, podobně, jak to bylo popsáno u bulbektomovaných zvířat po amfetaminu (Romeas et al. 2009) a kokainu (Slattery et al. 2007). Zvýšení lokomoce a stereotypií koreluje se zvýšenou dopaminergní signalizací ve striatu (Do et al. 2012; Di Chiara 1999; Hyman et al. 2006; Koob a Volkow 2016), což je v plném souladu s výsledky naší studie (Havlíčková et al. 2018).

## 10. Závěr

Naše výsledky (poprvé) doložily významnou úlohu ghreluinu/GHSR-1A v odměňovacích a posilovacích účincích metamfetaminu. Prokázali jsme, že premedikace ghrelinovým antagonistou, látkou JMV2959, u potkanů významně snížila spontánní příjem/auto-aplikaci metamfetaminu i vyhledávání metamfetaminu po období nucené abstinence (tendence k relapsu). Dále jsme doložili, že ghrelinový antagonismus (JMV2959) významně snížil proces podmiňování metamfetaminu s prostředím i vlastní projev/expresi metamfetaminem podmíněné preference místa (CPP). Výsledky těchto studií naznačují nadějný potenciál využití mechanismů ghrelinového antagonismu ke tlumení odměňovacích/posilovacích účinků metamfetaminu a podporují tak další výzkum těchto mechanismů, jež by mohl směřovat k vývoji nového efektivnějšího přístupu/léčiva pro terapii závislosti na metamfetaminu.

Druhá část práce se zabývala vztahy metamfetaminové závislosti v potkaním modelu deprese. Důležitým novým zjištěním bylo již nalezení rozdílů v bazálních hladinách dopaminu, serotoninu a jejich metabolitů a GABA a glutamátu mezi skupinami bulbektomovaných/OBX a „sham“/kontrolních zvířat. Významně snížené hladiny dopaminu, serotoninu a jejich metabolitů u OBX skupiny a zároveň zvýšené hladiny GABA a glutamátu potvrdily důležitost těchto neurotransmiterů v rozvoji depresivních poruch. Dalším podstatným zjištěním byly významné rozdíly mezi skupinami OBX a „sham“ v neurotransmitterových změnách v NAc vyvolané aplikací metamfetaminu. Pozorovali jsme výraznější efekt drogy právě u bulbektomovaných (OBX) zvířat, zejména významně zvýšené vyhlazení dopaminu a serotoninu. Také chování potkanů bylo v obou skupinách významně odlišné. Oproti kontrolní „sham“ skupině se u bulbektomovaných/OBX zvířat vyskytovala ve významně vyšší intenzitě i četnosti zvýšená lokomoce a typické metamfetaminem navozené stereotypní prvky. Naše studie tak poskytla komplexní neurobehaviorální popis akutního účinku metamfetaminu v potkaním modelu deprese, a je základem pro další budoucí výzkum, který by (při chronickém podávání metamfetaminu) více osvětlil sdílené patofyziologické procesy, jež jsou podkladem depresivní poruchy a odměny/posilovacích účinků metamfetaminu.

Výsledky obou studií podporují další výzkum, jenž by mohl směřovat k nalezení nových účinnějších postupů v zatím neuspokojivé terapii metamfetaminové závislosti.

## 11. Seznam použité literatury

- ABIZAID, A., Y.S. MINEUR, R.H. ROTH, J.D. ELSWORTH, M.W. SLEEMAN, M.R. PICCIOTTO a T.L. HORVATH. Reduced locomotor responses to cocaine in ghrelin-deficient mice. *Neuroscience*. 2011, 192, 500-506. ISSN 03064522. DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.06.001
- ANZENGRUBER, D., K.L. KLUMP, L. THORNTON, et al. Smoking in eating disorders. *Eating Behaviors*. 2006, 7(4), 291-299, DOI: 10.1016/j.eatbeh.2006.06.005. ISSN 14710153
- BALSTER, R.L. and C.R. SCHUSTER. A comparison of d-amphetamine, l-amphetamine, and methamphetamine self-administration in rhesus monkeys. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1973, 1(1), 67-71, DOI: 10.1016/0091-3057(73)90057-9. ISSN 00913057
- BARGER, G; DALE, H.H., Chemical Structure and Sympathomimetic Action of Amines; *J Physiol*. 1910 Oct 11; 41(1-2): 19–59
- BEDNAREK, M. A., FEIGHNER, S. D., PONG, S. S., MCKEE, K. K., HRENIUK, D. L., SILVA, M. V., & HECK, J. V. Structure– function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of medicinal chemistry*, 2000, 43(23), 4370-4376.
- BOWERS, C. & CHANG, J & MOMANY, F. & FOLKERS, K.. Effect of the enkephalins and enkephalin analogs on release of pituitary hormones in vitro. *Molecular Endocrinology*. 1977, 287-292.
- BRADY JV, Animal models for assessing drug of abuse. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 1991, 15, (1), 35-43
- CARROLL, M., C. FRANCE a R. MEISCH. Food deprivation increases oral and intravenous drug intake in rats. *Science*. 1979, 205(4403), 319-321. DOI: 10.1126/science.36665. ISSN 0036-8075
- CARTER M, SHIEH J; Guide to Research Techniques in Neuroscience, 2010
- CLIFFORD, P.S., J. RODRIGUEZ, D. SCHUL, et al. Attenuation of cocaine-induced locomotor sensitization in rats sustaining genetic or pharmacologic antagonism of ghrelin receptors. *Addiction Biology*. 2012, 17(6), 956-963. ISSN 13556215. DOI:10.1111/j.1369-1600.2011.00339.x

- COSTANTINO, L. and D. BARLOCCO. Ghrelin receptor modulators: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2014, 24(9), 1007-1019. DOI: 10.1517/13543776.2014.941531. ISSN 1354-3776
- CRUICKSHANK, C.C. a K.R. DYER. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*. 2009, 104(7), 1085-1099. DOI: 10.1111/j.1360-0443.2009.02564.x. ISSN 09652140
- CUMMINGS, D. & PURNELL, J.Q. & FRAYO, R.S. & SCHMIDOVA, K & WISSE, BRENT & S. A. WEIGLE, D.. A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes*. 50. 2001, 1714-9. 10.2337/diabetes.50.8.1714.
- CUMMINGS, D. & S. FRAYO, R & MARMONIER, C. & AUBERT, R. & CHAPELOT, D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 287. 2004, E297-304. 10.1152/ajpendo.00582.2003.
- DATE, Y., M. KOJIMA, H. HOSODA, et al. Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans 1. *Endocrinology*. 2000b, 141(11), 4255-4261. DOI: 10.1210/endo.141.11.7757. ISSN 0013-7227.
- DATE, Y., N. MURAKAMI, M. KOJIMA, T. KUROIWA, S. MATSUKURA, K. KANGAWA a M. NAKAZATO. Central Effects of a Novel Acylated Peptide, Ghrelin, on Growth Hormone Release in Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000a, 275(2), 477-480. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3342. ISSN 0006291X
- DAVIS, K.W., P.J. WELLMAN a P.S. CLIFFORD. Augmented cocaine conditioned place preference in rats pretreated with systemic ghrelin. *Regulatory Peptides*. 2007, 140(3), 148-152. DOI: 10.1016/j.regpep.2006.12.003. ISSN 0167011
- DE SOUSA NJ, VACCARINO FJ; Preclinical Behavioral Approaches for Assessing the Reinforcing Properties of Drugs of Abuse; In *Vivo Neuromethods*, Eds A.A. Boulton, G.B. Baker and A.N. Bateson, Humana Press Inc, 1998
- DI CHIARA, Gaetano. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *European Journal of Pharmacology*. 1999, 375(1-3), 13-30. DOI: 10.1016/S0014-2999(99)00372-6. ISSN 00142999
- DICKSON, S. L., E. EGECIOGLU, S. LANDGREN, K. P. SKIBICKA, J. A. ENGEL a E. JERLHAG. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical

- drugs. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011, 340(1), 80-87. DOI: 10.1016/j.mce.2011.02.017. ISSN 03037207
- DO, J., J.-I. KIM, J. BAKES, K. LEE a B.-K. KAANG. Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. *Learning & Memory*. 2012, 20(1), 21-28 DOI: 10.1101/lm.025015.111. ISSN 1072-0502
- EGECIOGLU, E., E. JERLHAG, N. SALOMÉ, et al. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addiction Biology*, 2010, 15(3), 304-311 DOI: 10.1111/j.1369-1600.2010.00216.x. ISSN 13556215
- ELKASHEF, A., F. VOCCI, G. HANSON, J. WHITE, W. WICKES a J. TIIHONEN. Pharmacotherapy of Methamphetamine Addiction: An Update. *Substance Abuse*. 2008, 29(3), 31-49. DOI: 10.1080/08897070802218554. ISSN 0889-7077
- EMCDDA & Europol, Metamfetamin (pervitin): Situace v EU a její globální kontext. Praha: Centrum Adiktologie a sdružení SCAN, 2010
- ENGEL, J. A. a E. JERLHAG. Role of Appetite-Regulating Peptides in the Pathophysiology of Addiction: Implications for Pharmacotherapy. *CNS Drugs*. 2014, 28(10), 875-886. DOI: 10.1007/s40263-014-0178-y. ISSN 1172-7047
- ESLER, W. P., J. RUDOLPH, T. H. CLAUS, et al. Small-Molecule Ghrelin Receptor Antagonists Improve Glucose Tolerance, Suppress Appetite, and Promote Weight Loss. *Endocrinology*. 2007, 148(11), 5175-5185. DOI: 10.1210/en.2007-0239. ISSN 0013-7227
- EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION (2017), European Drug Report 2017: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg
- EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION: The current drug situation in Europe, European monitoring centre for drugs and drug addiction, 2011
- FELDMAN R, MEYER JS, QUENZER LF; Stimulants: amphetamine and cocaine In *Principles of neuropsychopharmacology*, Sinauer Associates Publishers: Sunderland, MA, 1997
- Ghrelin receptor (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. 2019; 2019(4) guidetopharmacology.org

- GLASNER-EDWARDS, S. and L. J. MOONEY. Methamphetamine Psychosis: Epidemiology and Management. *CNS Drugs* 2014, 28(12), 1115-1126. DOI: 10.1007/s40263-014-0209-8. ISSN 1172-7047
- GOMEZ, J. L., C. L. CUNNINGHAM, D. A. FINN, et al. Differential effects of ghrelin antagonists on alcohol drinking and reinforcement in mouse and rat models of alcohol dependence. *Neuropharmacology*. 2015, 97, 182-193. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.026. ISSN 00283908
- GOODWIN, J. S., G. A. LARSON, J. SWANT, N. SEN, J. A. JAVITCH, N. R. ZAHNISER, L. J. DE FELICE a H. KHOSHBOUEI. Amphetamine and Methamphetamine Differentially Affect Dopamine Transporters in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, 284(5), 2978-2989. DOI: 10.1074/jbc.M805298200. ISSN 0021-9258
- GRIGSON, P. S. Like drugs for chocolate. *Physiology & Behavior*. 2002, 76(3), 389-395. DOI: 10.1016/S0031-9384(02)00758-8. ISSN 00319384
- HALL, D. H. aj. E. QUEENER. Self-Medication Hypothesis of Substance Use: Testing Khantzian's Updated Theory. *Journal of Psychoactive Drugs*. 2007, 39(2), 151-158. DOI: 10.1080/02791072.2007.10399873. ISSN 0279-1072
- HALL, D. A., J. J. STANIS, H. MARQUEZ AVILA aj. M. GULLEY. A comparison of amphetamine- and methamphetamine-induced locomotor activity in rats: evidence for qualitative differences in behavior. *Psychopharmacology*. 2007, 195(4), 469-478. DOI: 10.1007/s00213-007-0923-8. ISSN 0033-3158
- HAMPL K: Substituční léčba závislosti na pervitinu. *Česká a slovenská Psychiatrie*, 100, 2004, No. 5, pp. 274 – 278; 2004
- HAVLICKOVA, T., C. CHARALAMBOUS, M. LAPKA, N. PUSKINA, P. JERABEK a M. SUSTKOVA-FISEROVA. Ghrelin Receptor Antagonism of Methamphetamine-Induced Conditioned Place Preference and Intravenous Self-Administration in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(10) DOI: 10.3390/ijms19102925. ISSN 1422-0067
- HO, Ying-Jui, Yi-Chen CHANG, Tzuo-Mei LIU, Mei-Yun TAI, Chih-Shung WONG a Yuan-Feen TSAI. Striatal glutamate release during novelty exposure-induced hyperactivity in olfactory bulbectomized rats. *Neuroscience Letters*. 2000, 287(2), 117-120 DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01152-6. ISSN 03043940
- HOLMA, I. A. K., K. M. HOLMA, T. K. MELARTIN, M. KETOKIVI a E. T. ISOMETSÄ. Depression and smoking: a 5-year prospective study of patients with major depressive

- disorder. *Depression and Anxiety*. 2013, 30(6), 580-588. DOI: 10.1002/da.22108. ISSN 10914269
- HOLMES, P. V., C. V. MASINI, S. D. PRIMEAUX, J. L. GARRETT, A. ZELLNER, K. S. STOGNER, A. A. DUNCAN a D. CRYSTAL. Intravenous self-administration of amphetamine is increased in a rat model of depression. *Synapse*. 2002, 46(1), 4-10. DOI: 10.1002/syn.10105. ISSN 0887-4476
- HOLST, B., A. CYGANKIEWICZ, T. H. JENSEN, M. ANKERSEN a T. W. SCHWARTZ. High Constitutive Signaling of the Ghrelin Receptor—Identification of a Potent Inverse Agonist. *Molecular Endocrinology*. 2003, 17(11), 2201-2210. DOI: 10.1210/me.2003-0069. ISSN 0888-8809
- HOWELL, L. L. a H. L. KIMMEL. Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochemical Pharmacology*, 2008, 75(1), 196-217. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.08.003. ISSN 00062952
- HYMAN, S. E., R. C. MALENKA a E. J. NESTLER. NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*. 2006, 29(1), 565-598. DOI: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009. ISSN 0147-006X
- JENŠOVSKÝ J, LEBL J, CHRISTIANSEN JS: Růstový hormon (Growth hormone), Galen, Prague, 2000
- JERABEK, P., T. HAVLICKOVA, N. PUSKINA, C. CHARALAMBOUS, M. LAPKA, P. KACER a M. SUSTKOVA-FISEROVA. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochemistry International*. 2017, 110, 101-113. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.09.013. ISSN 01970186
- JERLHAG, E., E. EGECIOGLU, S. LANDGREN, et al. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(27), 11318-11323. DOI: 10.1073/pnas.0812809106. ISSN 0027-8424
- JERLHAG, E. a J. A. ENGEL. Ghrelin receptor antagonism attenuates nicotine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release and conditioned place preference in mice. *Drug and Alcohol Dependence*. 2011, 117(2-3), 126-131. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2011.01.010. ISSN 03768716
- JERLHAG, E., E. EGECIOGLU, S. L. DICKSON a J. A. ENGEL. Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation,



- accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacology*. 2010, 211(4), 415-422. DOI: 10.1007/s00213-010-1907-7. ISSN 0033-3158
- JERLHAG, E., E. EGECIOGLU, S. L. DICKSON, A. DOUHAN, L. SVENSSON a J. A. ENGEL. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addiction Biology*, 2007, 12(1), 6-16. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2006.00041.x. ISSN 1355-6215
- JERLHAG, E. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addiction Biology*. 2008, 13(3-4), 358-363. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2008.00125.x. ISSN 13556215
- JIAO, D, Y. LIU, X. LI, J. LIU a M. ZHAO. The role of the GABA system in amphetamine-type stimulant use disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015, 9. DOI: 10.3389/fncel.2015.00162. ISSN 1662-5102
- KALAFATELI, A. L., D. VALLÖF, J. W. JÖRNULF, M. HEILIG a E. JERLHAG. A cannabinoid receptor antagonist attenuates ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system in mice. *Physiology & Behavior*. 2018, 184, 211-219. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.12.005. ISSN 00319384
- KALINA K a kol., *Klinická adiktologie*, 2015
- KALINA K et al., *Drogy a drogové závislosti 1 mezioborový přístup*, 2003
- KARILA, L., A. WEINSTEIN, H.-J. AUBIN, A. BENYAMINA, M. REYNAUD a S. L. BATKI. Pharmacological approaches to methamphetamine dependence: a focused review. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010, 69(6), 578-592. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2010.03639.x. ISSN 03065251
- KLEIJN, J., J. WISKERKE, T.I.F.H. CREMERS, A.N.M. SCHOFFELMEER, B.H.C. WESTERINK a T. PATTIJ. Effects of amphetamine on dopamine release in the rat nucleus accumbens shell region depend on cannabinoid CB1 receptor activation. *Neurochemistry International*. 2012, 60(8), 791-798. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.03.002. ISSN 01970186
- KOEK W, CHENG K, RICE KC.. Discriminative stimulus effects of the GABAB receptor-positive modulator rac-BHFF: comparison with GABAB receptor agonists and drugs of abuse. *J Pharmacol Exp Ther* 344:553–560, 2013, DOI: 10.1124/jpet.112.202226

- KOJIMA, M., H. HOSODA, Y. DATE, M. NAKAZATO, H. MATSUO a K. KANGAWA. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999, 402(6762), 656-660. DOI: 10.1038/45230. ISSN 0028-0836
- KOOB, G. F. a N. D. VOLKOW. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*. 2016, 3(8), 760-773. DOI: 10.1016/S2215-0366(16)00104-8. ISSN 22150366
- KOOB, G. F. a N. D. VOLKOW. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010, 35(1), 217-238. DOI: 10.1038/npp.2009.110. ISSN 0893-133X
- KOOPMANN, A., R. SCHUSTER a F. KIEFER. The impact of the appetite-regulating, orexigenic peptide ghrelin on alcohol use disorders: A systematic review of preclinical and clinical data. *Biological Psychology*. 2018, 131, 14-30. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2016.12.012. ISSN 03010511
- KUCEROVA, J., J. PISTOVCAKOVA, D. VRSKOVA, L. DUSEK a A. SULCOVA. The effects of methamphetamine self-administration on behavioural sensitization in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2012, 15(10), 1503-1511. DOI: 10.1017/S1461145711001684. ISSN 1461-1457
- LALL, S., L. Y.C TUNG, C. OHLSSON, J.-O. JANSSON a S. L. DICKSON. Growth Hormone (GH)-Independent Stimulation of Adiposity by GH Secretagogues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001, 280(1), 132-138. DOI: 10.1006/bbrc.2000.4065. ISSN 0006291X
- LAMB, P. B., C. J. MCELHINNY, T. SNINSKI, H. PURDOM, F. I. CARROLL a A. H. LEWIN. High specific activity (+)-amphetamine and (+)-methamphetamine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2009, 52(11), 457-462. DOI: 10.1002/jlcr.1659. ISSN 03624803
- LANDGREN, S., J. A. SIMMS, P. HYYTIÄ, J. A. ENGEL, S. E. BARTLETT a Elisabet JERLHAG. Ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonism suppresses both operant alcohol self-administration and high alcohol consumption in rats. *Addiction Biology*. 2012, 17(1), 86-94. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2010.00280.x. ISSN 13556215
- LEE, M. R., J. D. TAPOCIK, M. GHAREEB, et al. The novel ghrelin receptor inverse agonist PF-5190457 administered with alcohol: preclinical safety experiments and a phase 1b human laboratory study. *Molecular Psychiatry*, 2018. DOI: 10.1038/s41380-018-0064-y. ISSN 1359-4184

- LINCOVÁ D. et al., Základní a aplikovaná farmakologie, Galén 2002
- LIPINA, T. V, P. J FLETCHER, F. H LEE, A. HC WONG a J. C RODER. Disrupted-In-Schizophrenia-1 Gln31Leu Polymorphism Results in Social Anhedonia Associated with Monoaminergic Imbalance and Reduction of CREB and  $\beta$ -arrestin-1,2 in the Nucleus Accumbens in a Mouse Model of Depression. *Neuropsychopharmacology*. 2013, 38(3), 423-436. DOI: 10.1038/npp.2012.197. ISSN 0893-133X
- LÜLLMANN H et al., Farmakologie a toxikologie, Grada 2004
- MARKOU, A. Neurobiological Similarities in Depression and Drug Dependence: A Self-Medication Hypothesis. 1998, *Neuropsychopharmacology*. 18(3), 135-174. DOI: 10.1016/S0893-133X(97)00113-9. ISSN 0893133X
- MASINI, C. V., P. V. HOLMES, K. G. FREEMAN, A. C. MAKI a G. L. EDWARDS. Dopamine overflow is increased in olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Physiology & Behavior*. 2004, 81(1), 111-119. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.01.003. ISSN 00319384
- MASUDA, Y., T. TANAKA, N. INOMATA, et al. Ghrelin Stimulates Gastric Acid Secretion and Motility in Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, 276(3), 905-908. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3568. ISSN 0006291X
- MATSUMOTO, T., Y. MAENO, H. KATO, Y. SEKO-NAKAMURA, J. MONMA-OHTAKI, A. ISHIBA, M. NAGAO a Y. AOKI. 5-hydroxytryptamine- and dopamine-releasing effects of ring-substituted amphetamines on rat brain: A comparative study using in vivo microdialysis. *European Neuropsychopharmacology*. 2014, 24(8), 1362-1370. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2014.04.009. ISSN 0924977X
- MCKETIN, R., D. I. LUBMAN, N. M LEE, J. E ROSS a T. N SLADE. Major depression among methamphetamine users entering drug treatment programs. *Medical Journal of Australia*. 2011, 195(S3). DOI: 10.5694/j.1326-5377.2011.tb03266.x. ISSN 0025-729X
- MENDELSON, J., N. UEMURA, D. HARRIS, R. NATH, E. FERNANDEZ, P. JACOBIII, E. EVERHART a R. JONES. Human pharmacology of the methamphetamine stereoisomers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006, 80(4), 403-420. DOI: 10.1016/j.clpt.2006.06.013. ISSN 00099236
- MEYER JS, QUENZER LF, Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior, 2005
- M'KADMI, C., J.-P. LEYRIS, L. ONFROY, et al. Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290(45), 27021-27039. DOI: 10.1074/jbc.M115.659250. ISSN 0021-9258

- MOULIN, A., J. RYAN, J. MARTINEZ a J.-A. FEHRENTZ. Recent Developments in Ghrelin Receptor Ligands. *ChemMedChem*. 2007, 2(9), 1242-1259. DOI: 10.1002/cmdc.200700015. ISSN 18607179
- MOULIN, A., L. BRUNEL, D. BOEGLIN, et al. The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids*. 2013, 44(2), 301-314.. DOI: 10.1007/s00726-012-1355-2. ISSN 0939-4451
- MRAVČÍK, V., CHOMYNOVÁ, P., GROHMANNOVÁ, K., JANÍKOVÁ, B., ČERNÍKOVÁ, T., ROUS, Z., TION LEŠTINOVÁ, Z., KIŠŠOVÁ, L., NECHANSKÁ, B., VLACH, T., FIDESOVÁ, H., VOPRAVIL, J. 2018. Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2017 [Annual Report on Drug Situation 2017 - Czech Republic] MRAVČÍK, V. (Ed.). Praha: Úřad vlády České republiky. ISBN 978-80-7440-219-7
- MÜLLER, T.D., R. NOGUEIRAS, M.L. ANDERMANN, et al. Ghrelin. *Molecular Metabolism*. 2015, 4(6), 437-460 DOI: 10.1016/j.molmet.2015.03.005. ISSN 22128778
- NARAYANAN, N. S., D. J. GUARNIERI a R. J. DILEONE. Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2010, 31(1), 104-112. DOI: 10.1016/j.yfrne.2009.10.004. ISSN 00913022
- NESTLER, E. J. a W. A. CARLEZON. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biological Psychiatry*. 2006, 59(12), 1151-1159. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.09.018. ISSN 00063223
- PÁLENÍČEK T: Syntetické drogy nově se vyskytující na ilegální drogové scéně, *Psychiatrie pro praxi*, 2005
- PANAGOPOULOS, V. N. a E. RALEVSKI. The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology*. 2014, 231(14), 2725-2740. DOI: 10.1007/s00213-014-3640-0. ISSN 0033-3158
- PAXINOS G, WATSON C; The rat brain in stereotaxic coordinates, Amsterdam: Elsevier, 2007
- PITTENGER, S. T., S. T. BARRETT, S. CHOU a R. A. BEVINS. The effects of varenicline on methamphetamine self-administration and drug-primed reinstatement in female rats. *Behavioural Brain Research*. 2016, 300, 150-159, DOI: 10.1016/j.bbr.2015.11.033. ISSN 01664328

- PUSHKINA N, SUSTKOVA-FISEROVA M. Pre-clinical Addiction Research: Selected Methods [Vybrané metody preklinického výzkumu v adiktologii], *Adiktologie*, 14(3), 264–283, 2014.
- QUESSEVEUR, G., A. GARDIER a B. GUIARD. The Monoaminergic Tripartite Synapse: A Putative Target for Currently Available Antidepressant Drugs. *Current Drug Targets*. 2013, 14(11), 1277-1294. DOI: 10.2174/13894501113149990209. ISSN 13894501
- RODRIGUEZ, J. S., S. Y. BOCTOR, L. C. FLORES, C. F. PHELIX a J. L. MARTINEZ. Local pretreatment with the cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 attenuates methamphetamine intra-accumbens self-administration. *Neuroscience Letters*. 2011, 489(3), 187-191. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.12.013. ISSN 03043940
- RODRIGUEZ, J. A., J.-A. FEHRENTZ, J. MARTINEZ, K. BEN HAJ SALAH a P. J. WELLMAN. The GHR-R antagonist JMV 2959 neither induces malaise nor alters the malaise property of LiCl in the adult male rat. *Physiology & Behavior*. 2018, 183, 46-48. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.10.017. ISSN 00319384
- ROMEAS, T., M.-C. MORISSETTE, O. MNIE-FILALI, G. PIÑEYRO a S. M. BOYE. Simultaneous anhedonia and exaggerated locomotor activation in an animal model of depression. *Psychopharmacology*. 2009, 205(2), 293-303. DOI: 10.1007/s00213-009-1539-y. ISSN 0033-3158
- ROSE, M. E. a J. E. GRANT. Pharmacotherapy for Methamphetamine Dependence: A Review of the Pathophysiology of Methamphetamine Addiction and the Theoretical Basis and Efficacy of Pharmacotherapeutic Interventions. *Annals of Clinical Psychiatry*. 2008, 20(3), 145-155. DOI: 10.1080/10401230802177656. ISSN 10401237
- ROSICKA, M., KRSEK, M., JARKOVSKA, Z., MAREK, J., & SCHREIBER, V. (2002). Ghrelin-a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiological research*, 51(5), 435-442.
- RUDA-KUCEROVA, J., P. AMCHOVA, T. HAVLICKOVA, P. JERABEK, Z. BABINSKA, P. KACER, K. SYSLOVA, A. SULCOVA, M. SUSTKOVA-FISEROVA, Reward related neurotransmitter changes in a model of depression: An in vivo microdialysis study. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2015, 16(7), 521-535, DOI: 10.3109/15622975.2015.1077991. ISSN 1562-2975
- SANCHIS-SEGURA, C. and R. SPANAGEL. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*. 2006, 11(1), 2-38. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x. ISSN 1355-6215

- SCHOFFELMEER, A. N. M., L. J. M. J. VANDERSCHUREN, T. J. DE VRIES, F. HOGENBOOM, G. WARDEH a A. H. MULDER. Synergistically Interacting Dopamine D1 and NMDA Receptors Mediate Nonvesicular Transporter-Dependent GABA Release from Rat Striatal Medium Spiny Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2000, 20(9), 3496-3503 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-09-03496.2000. ISSN 0270-6474
- SLATTERY, D. A., A. MARKOU and J. F. CRYAN. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology*. 2007, 190(4), 555-568. DOI: 10.1007/s00213-006-0630-x. ISSN 0033-3158
- SONG, C. a B. E. LEONARD. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005, 29(4-5), 627-647. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.010. ISSN 01497634
- SU, H. and M. ZHAO. Endocannabinoid mechanism in amphetamine-type stimulant use disorders: A short review. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2017, 46, 9-12. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.08.042. ISSN 09675868
- SUCHANKOVA, P., E. JERLHAG, N. JAYARAM-LINDSTRÖM, et al. Genetic Variation of the Ghrelin Signalling System in Individuals with Amphetamine Dependence. *PLoS ONE*. 2013b, 8(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0061242. ISSN 1932-6203.
- SUCHANKOVA, P., J. A. ENGEL a E. JERLHAG. Sub-chronic Ghrelin Receptor Blockade Attenuates Alcohol- and Amphetamine-Induced Locomotor Stimulation in Mice. *Alcohol and Alcoholism*. 2016, 51(2), 121-127. ISSN 0735-0414. DOI:10.1093/alcalc/agv100
- SUCHANKOVA, P., P. STEENSLAND, I. FREDRIKSSON, J. A. ENGEL, E. JERLHAG a G. A. DE ERAUSQUIN. Ghrelin Receptor (GHS-R1A) Antagonism Suppresses Both Alcohol Consumption and the Alcohol Deprivation Effect in Rats following Long-Term Voluntary Alcohol Consumption. *PLoS ONE*. 2013a, 8(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0071284. ISSN 1932-6203.
- SUSTKOVA-FISEROVA, M., C. CHARALAMBOUS, T. HAVLICKOVA, M. LAPKA, P. JERABEK, N. PUSKINA a K. SYSLOVA. Alterations in Rat Accumbens Endocannabinoid and GABA Content during Fentanyl Treatment: The Role of Ghrelin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(11). DOI: 10.3390/ijms18112486. ISSN 1422-0067.
- SUSTKOVA-FISEROVA, M., N. PUSKINA, T. HAVLICKOVA, M. LAPKA, K. SYSLOVA, V. POHORALA a C. CHARALAMBOUS. Ghrelin receptor antagonism of fentanyl-induced conditioned place preference, intravenous self-administration, and

- dopamine release in the nucleus accumbens in rats [published online ahead of print, 2019 Nov 6]. *Addict Biol.* 2019;e12845. doi:10.1111/adb.12845
- SUSTKOVA-FISEROVA, M., P. JERABEK, T. HAVLICKOVA, K. SYSLOVA a P. KACER. Ghrelin and endocannabinoids participation in morphine-induced effects in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology.* 2016, 233(3), 469-484. DOI: 10.1007/s00213-015-4119-3. ISSN 0033-3158
- SUSTKOVA-FISEROVA, M., P. JERABEK, T. HAVLICKOVA, P. KACER a M. KRŠIAK. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology.* 2014, 231(14), 2899-2908. DOI: 10.1007/s00213-014-3466-9. ISSN 0033-3158
- ŠVIHOVEC, J., J. BULTAS, P. ANZENBACHER, J. CHLÁDEK, J. PŘÍBORSKÝ, J. SLÍVA a M. VOTAVA, ed. *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.
- TASLIMI, Z., A. KOMAKI, A. HAGHPARAST a A. SARIHI. Effects of Acute and Chronic Restraint Stress on Reinstatement of Extinguished Methamphetamine-induced Conditioned Place Preference in Rats. *Basic and Clinical Neuroscience Journal.* 2018, 9(3), 157-166. DOI: 10.29252/nirp.bcn.9.3.157. ISSN 2008-126X
- TESTA A<sup>1</sup>, GIANNUZZI R, SOLLAZZO F, PETRONGOLO L, BERNARDINI L, DAIN S., Psychiatric emergencies (part II): psychiatric disorders coexisting with organic diseases, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013 Feb;17 Suppl 1: 65-85
- THIEMANN, G, M VANDERSTELT, S PETROSINO, A MOLLEMAN, V DIMARZO a R HASENOHRL. The role of the CB1 cannabinoid receptor and its endogenous ligands, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, in amphetamine-induced behavioural sensitization. *Behavioural Brain Research.* 2008, 187(2), 289-296. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.09.022. ISSN 01664328
- THRASH, B., K. THIRUCHELVAN, M. AHUJA, V. SUPPIRAMANIAM a M. DHANASEKARAN. Methamphetamine-induced neurotoxicity: the road to Parkinson's disease. *Pharmacological Reports.* 2009, 61(6), 966-977. DOI: 10.1016/S1734-1140(09)70158-6. ISSN 17341140
- TREIT D, MENARD J; Animal Models of Anxiety and Depression, In Vivo Neuromethods, Eds A.A. Boulton, G.B. Baker and A.N. Bateson, Humana Press Inc, 1998
- TSCHÖP, M., D. L. SMILEY a M. L. HEIMAN. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 2000, 407(6806), 908-913. DOI: 10.1038/35038090. ISSN 0028-0836

- TZSCHENTKE, T. M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications - An introduction. *Amino Acids*. 2002, 23(1-3), 147-152. DOI: 10.1007/s00726-001-0120-8. ISSN 0939-4451
- VAN DER KAM, E. L., J. DE VRY a T. M. TZSCHENTKE. The mGlu5 receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP) supports intravenous self-administration and induces conditioned place preference in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 2009, 607(1-3), 114-120. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.01.049. ISSN 00142999
- VINKLEROVÁ, J., J. NOVÁKOVÁ a A. ŠULCOVÁ. Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. *Journal of Psychopharmacology*. 2002, 16(2), 139-143. DOI: 10.1177/026988110201600204. ISSN 0269-8811
- VOLKOW ND, WANG GJ, FOWLER JS, TOMASI D, TELANG F. Addiction: Beyond dopamine reward circuitry, PNAS September 13, vol. 108, no. 37: 15037-15042, 2011
- WELLMAN PJ, HOLLAS CN, ELLIOTT AE. Systemic ghrelin sensitizes cocaine-induced hyperlocomotion in rats. *Regulatory Peptides*. 2008 Feb;146(1-3):33-37. DOI: 10.1016/j.regpep.2007.07.007
- WELLMAN, P. J., P. S. CLIFFORD a J. A. RODRIGUEZ. Ghrelin and ghrelin receptor modulation of psychostimulant action. *Frontiers in Neuroscience*. 2013, 7. DOI: 10.3389/fnins.2013.00171. ISSN 1662-453X;
- WELLMAN, P. J., P. S. CLIFFORD, J. RODRIGUEZ, S. HUGHES, S. EITAN, L. BRUNEL, J.-A. FEHRENTZ a J. MARTINEZ. Pharmacologic antagonism of ghrelin receptors attenuates development of nicotine induced locomotor sensitization in rats. *Regulatory Peptides*. 2011, 172(1-3), 77-80. ISSN 01670115. DOI:10.1016/j.regpep.2011.08.014
- YOKEL, R A, and R PICKENS. Self-administration of optical isomers of amphetamine and methylamphetamine by rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* vol. 187,1 (1973): 27-33.
- ZAKHAROVA, E., G. LEONI, I. KICHKO a S. IZENWASSER. Differential effects of methamphetamine and cocaine on conditioned place preference and locomotor activity in adult and adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*. 2009, 198(1), 45-50 DOI: 10.1016/j.bbr.2008.10.019. ISSN 01664328
- ZALLAR, L. J., M. FAROKHNIA, B. J. TUNSTALL, L. F. VENDRUSCOLO a L. LEGGIO. The Role of the Ghrelin System in Drug Addiction. *The Role of Neuropeptides*



*in Addiction and Disorders of Excessive Consumption*. Elsevier, 2017, 2017, s. 89-119. International Review of Neurobiology. ISBN 9780128124734. DOI:10.1016/bs.irn.2017.08.002

ZELLNER, M. R., D. F. WATT, M. SOLMS aj. PANKSEPP. Affective neuroscientific and neuropsychanalytic approaches to two intractable psychiatric problems: Why depression feels so bad and what addicts really want. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2011, 35(9), 2000-2008. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.01.003. ISSN 01497634

## 12. Přílohy

### 12.1. Celkový seznam publikací autora

**HAVLICKOVA, T.**, C. CHARALAMBOUS, M. LAPKA, N. PUSKINA, P. JERABEK a M. SUSTKOVA-FISEROVA. Ghrelin Receptor Antagonism of Methamphetamine-Induced Conditioned Place Preference and Intravenous Self-Administration in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(10) DOI: 10.3390/ijms19102925. ISSN 1422-0067

RUDA-KUCEROVA, J., P. AMCHOVA, **T. HAVLICKOVA**, P. JERABEK, Z. BABINSKA, P. KACER, K. SYSLOVA, A. SULCOVA, M. SUSTKOVA-FISEROVA, Reward related neurotransmitter changes in a model of depression: An in vivo microdialysis study. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2015, 16(7), 521-535, DOI: 10.3109/15622975.2015.1077991. ISSN 1562-2975

SUSTKOVA-FISEROVA, M., C. CHARALAMBOUS, **T. HAVLICKOVA**, M. LAPKA, P. JERABEK, N. PUSKINA a K. SYSLOVA. Alterations in Rat Accumbens Endocannabinoid and GABA Content during Fentanyl Treatment: The Role of Ghrelin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(11). DOI: 10.3390/ijms18112486. ISSN 1422-0067.

SUSTKOVA-FISEROVA, M., N. PUSKINA, **T. HAVLICKOVA**, M. LAPKA, K. SYSLOVA, V. POHORALA a C. CHARALAMBOUS. Ghrelin receptor antagonism of fentanyl-induced conditioned place preference, intravenous self-administration, and dopamine release in the nucleus accumbens in rats [published online ahead of print, 2019 Nov 6]. *Addict Biol*. 2019;e12845. doi:10.1111/adb.12845

SUSTKOVA-FISEROVA, M., P. JERABEK, T. **HAVLICKOVA**, K. SYSLOVA a P. KACER. Ghrelin and endocannabinoids participation in morphine-induced effects in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology*. 2016, 233(3), 469-484. DOI: 10.1007/s00213-015-4119-3. ISSN 0033-3158

SUSTKOVA-FISEROVA, M., P. JERABEK, **T. HAVLICKOVA**, P. KACER a M. KRSIAK. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced accumbens dopamine release and behavioral stimulation in rats. *Psychopharmacology*. 2014, 231(14), 2899-2908. DOI: 10.1007/s00213-014-3466-9. ISSN 0033-3158

JERABEK, P., **T. HAVLICKOVA**, N. PUSKINA, C. CHARALAMBOUS, M. LAPKA, P. KACER a M. SUSTKOVA-FISEROVA. Ghrelin receptor antagonism of morphine-induced conditioned place preference and behavioral and accumbens dopaminergic sensitization in rats. *Neurochemistry International*. 2017, 110, 101-113. DOI: 10.1016/j.neuint.2017.09.013. ISSN 01970186

## **12.2. Seznam příložených publikací**

**HAVLICKOVA, T.**, C. CHARALAMBOUS, M. LAPKA, N. PUSKINA, P. JERABEK a M. SUSTKOVA-FISEROVA. Ghrelin Receptor Antagonism of Methamphetamine-Induced Conditioned Place Preference and Intravenous Self-Administration in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(10) DOI: 10.3390/ijms19102925. ISSN 1422-0067

RUDA-KUCEROVA, J., P. AMCHOVA, **T. HAVLICKOVA**, P. JERABEK, Z. BABINSKA, P. KACER, K. SYSLOVA, A. SULCOVA, M. SUSTKOVA-FISEROVA, Reward related neurotransmitter changes in a model of depression: An in vivo microdialysis study. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2015, 16(7), 521-535, DOI: 10.3109/15622975.2015.1077991. ISSN 1562-2975